

Ensayo de (1→3)- β -D-glucano en suero

ENSAYO FUNGITELL®

Instrucciones de uso



PN001268-es Rev13

REF FT001

2024-09-05

Visite www.acciusa.com para obtener las instrucciones de uso en su idioma.Este producto es para uso diagnóstico *in vitro* y uso profesional solamente.

1. Indicaciones

El ensayo Fungitell® es una prueba colorimétrica basada en zimógenos de proteasas para la detección cualitativa de (1→3)- β -D-glucano en el suero de pacientes con síntomas de infección fungica invasiva o con enfermedades que predispongan a dicha infección. La concentración sérica de (1→3)- β -D-glucano, uno de los principales componentes de la pared celular de varios hongos clínicamente relevantes¹, puede emplearse para facilitar el diagnóstico de las micosis profundas y fúngicas². Un resultado positivo no indica qué género de hongos puede ser el causante de la infección.

Los valores de (1→3)- β -D-glucano deben utilizarse junto con otros procedimientos diagnósticos, como el cultivo microbiológico, el examen histológico de muestras de biopsia y la exploración radiológica.

Importante

Suministre esta información al médico que solicite la prueba: Ciertos hongos, como el género *Cryptococcus*, que producen concentraciones muy bajas de (1→3)- β -D-glucano, pueden no dar lugar a unos niveles séricos de (1→3)- β -D-glucano suficientemente altos como para que los detecte el ensayo^{3,4}. Las infecciones por hongos del orden Mucorales, como *Absidia*, *Mucor* y *Rhizopus*^{5,6}, de los que no se tiene constancia que produzcan (1→3)- β -D-glucano, también producen bajos niveles séricos de (1→3)- β -D-glucano. Además, la fase levaduriforme de *Blastomycetes dermatitidis* produce poco (1→3)- β -D-glucano, por lo que es posible que el ensayo no lo detecte⁵.

Incluya esta declaración al notificar los resultados del ensayo Fungitell®.

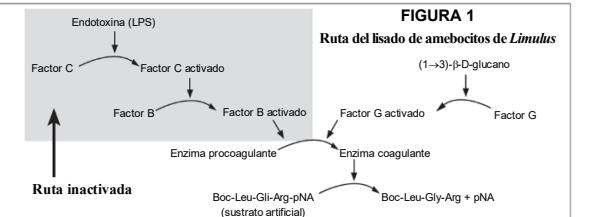
2. Resumen y Explicación

Hay una creciente incidencia de infecciones fúngicas por patógenos oportunistas, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos^{6,7,8}. Las enfermedades fúngicas invasivas, como infecciones oportunistas, son habituales entre los pacientes de cáncer hematológico y de SIDA, y son responsables de un número cada vez mayor de infecciones intrahospitalarias, sobre todo entre los receptores de trasplantes de órganos y entre otros pacientes que reciben tratamientos inmunosupresores^{9,10}. Muchas infecciones fúngicas se adquieren inhalando esporas fúngicas originadas en la tierra, en detritos de plantas, en sistemas de tratamiento de aire o en superficies al descubrirlo. Algunos hongos oportunistas están presentes en la piel humana, el tubo digestivo y las mucosas^{11,12}. El diagnóstico de las micosis y las fungemias invasivas suele basarse en un diagnóstico no específico o en técnicas radiológicas. Recientemente se han añadido marcadores biológicos de infección fúngica a los métodos diagnósticos disponibles².

Los patógenos fúngicos oportunistas incluyen *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* y *Pneumocystis jirovecii*. El (1→3)- β -D-glucano producido por estos y otros microorganismos puede detectarse mediante el ensayo Fungitell®^{8,13,14}.

3. Principio del Procedimiento

El ensayo Fungitell® mide el (1→3)- β -D-glucano. El ensayo se basa en una modificación de la ruta del lisado de amebocitos *Limulus* (LAL)^{15,16,17,18}, figura 1. El reactivo Fungitell® se modifica para eliminar la reactividad a las endotoxinas bacterianas para que, de este modo, reaccione únicamente al (1→3)- β -D-glucano por el lado de la ruta mediado por el factor G. El (1→3)- β -D-glucano activa el factor G, un zimógeno de serina proteasa. El factor G activado convierte la enzima procoagulante inactiva en la enzima coagulante activa que, a su vez, divide la para-nitroanilida (pNA) del sustrato de péptido cromogénico, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, lo que crea un cromóforo, la parainitroanilina, que se absorbe a 405 nm. El ensayo cromogénico Fungitell® descripto a continuación, se basa en la determinación de la tasa de aumento de la densidad óptica producida en una muestra. Esta tasa se interpreta con referencia a una curva patrón para obtener cálculos aproximados de la concentración de (1→3)- β -D-glucano en la muestra.



4. Materiales suministrados con el kit Fungitell®

El kit Fungitell® es para uso diagnóstico *in vitro*. Los siguientes materiales suministrados con cada kit son suficientes para analizar 110 pocillos en dos placas de microtitulación (55 pocillos en cada una):

- Reactivos Fungitell®, un LAL liofilizado específico de (1→3)- β -D-glucano (dos frascos).
- El reactivo Fungitell® se compone de lisado de amebocitos de *Limulus* (esto es, cangrejo hermético) y sustrato colorímetro Boc-Leu-Gly-Arg-pNA. No contiene proteínas humanas ni de mamífero.
- Támpon de reconstitución Pyrosol® (dos frascos). Pueden adquirirse más frascos de támpón de reconstitución Pyrosol (número de catálogo BC051) por separado. *Está compuesto por 0,2 M de Támpón Tris*.
- Patrón de glucano, (1→3)- β -D-glucano liofilizado de Pachyman (dos frascos). *El volumen de agua de reactivo a añadir se indica en la etiqueta del frasco. Se calibra con respecto a un patrón de referencia interno*.
- Agua para Reactivo LAL (LRW) (dos botellas)
- Nota:** 20 ml de agua de grado de reactivo (RGW) y los frascos de vidrio de LRW son equivalentes.
- Solución alcalina de pretratamiento (dos frascos) que contienen 0,125 M de hidróxido de potasio y 0,6 M de cloruro de potasio

Todo lo anterior, con la excepción del patrón, está libre de concentraciones interferentes de (1→3)- β -D-glucano.

5. Materiales Necesarios pero no Suministrados

Todos los materiales deben estar libres de glucano interferente.

- Pipetas de pipeta* (250 µl - número de catálogo PPT25, 1000 µl - número de catálogo PPT10)
- Pipetas capaces de administrar volúmenes de 5-25 µl y 100-1000 µl
- Pipeta de repetición con puntas capaces de administrar 100 µl
- Tubos de ensayo* para la preparación de la serie patrón (curva de calibración) y para combinar los reactivos del tratamiento del suero. (12 x 75 mm - número de catálogo TB240 o 13 x 100 mm - número de catálogo TB013)
- Lector de placas de incubación (37 °C) capaz de leer a 405 nm (preferiblemente capaz de obtener lecturas a dos longitudes de onda: 405 y 490 nm), con un rango dinámico de hasta un mínimo de 2,0 unidades de absorbancia, junto con software adecuado de ensayos cromáticos por ordenador.
- Tubos estériles libres de glucano para hacer alicuotas de las muestras. Pueden utilizarse tubos certificados como libres de ARNasas, ADNasas y piroígenos.
- Parafilm®
- Microplacas de 96 pocillos* **Nota:** El ensayo Fungitell® se ha validado con placas de las características siguientes: de poliestireno, estériles, sin revestimiento, de fondo plano, sin betaglucanos interferentes según las especificaciones de ACC y envasadas individualmente.

* Estos productos, suministrados por Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), están certificados como libres de glucanos interferentes.

6. Conservación de los Reactivos

- Conservar todos los reactivos, como se suministran, a 2-8 °C en la oscuridad.
- El reactivo Fungitell® reconstituido debe conservarse a 2-8 °C y utilizarse en un plazo de 2 horas. Otra opción consiste en congelar el reactivo Fungitell® a -20 °C, en cuyo caso puede conservarse un máximo de 20 días, descongelarse una sola vez y utilizarse.

7. Advertencias y precauciones

- No pipeteé ningún material con la boca. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se manipulen muestras o reactivos del kit.
- Siga la normativa operativa y de seguridad local.
- Utilice guantes protectores al manipular muestras biológicas que puedan ser infecciosas o peligrosas. Las manos enguantadas deberán considerarse contaminadas en todo momento; mantenga las manos enguantadas alejadas de los ojos, la boca y la nariz. Utilice protección ocular y una mascarilla quirúrgica si hay posibilidad de contaminación por aerosoles.
- Nota:** No deben utilizarse kits con el contenido dañado.
- Tratamiento de Residuos: los residuos de productos químicos y preparaciones se consideran por lo general desechos peligrosos. La eliminación de este tipo de desechos está regulada por leyes y normativas nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con empresas de gestión de residuos para obtener asesoramiento sobre la eliminación de desechos peligrosos.

• Las fichas de Datos de Seguridad para todos los componentes del kit Fungitell® se pueden descargar del sitio web de ACC: www.acciusa.com.

7.1 Precauciones procedimentales

El ensayo Fungitell® requiere mucha atención a la técnica y al entorno de análisis. Una formación técnica adecuada de los técnicos en el método de análisis y la evitación de la contaminación es esencial para la eficacia del ensayo.

- Utilice las prácticas correctas de laboratorio conforme a la normativa local. Este ensayo es sensible a la contaminación y a las inexactitudes en el pipeteo.
- Realice la prueba en un entorno limpio.
- Tenga en cuenta que el glucano, así como la contaminación por partículas fúngicas del cuerpo humano, la ropa, los recipientes, el agua y el polvo en suspensión pueden interferir en la prueba Fungitell®.
- Posibles fuentes de contaminación: materiales que contengan celulosa, como gasas, pañuelos de papel, cartones, pipetas de vidrio con tapones de algodón y puntas de pipeta con filtros de celulosa. Las vendas de gasa y las esponjas quirúrgicas también pueden secretar altas cantidades de (1→3)- β -D-glucano^{21,22}. Para obtener información sobre otras fuentes de contaminación relacionadas con el paciente, consulte la sección «Limitaciones de la prueba».
- No utilice los materiales después de su fecha de caducidad.

7.2 Manipulación de las muestras

- La recogida de sangre y la preparación de suero deberán realizarse de acuerdo con la normativa local pertinente. Recogida de las muestras: Las muestras de sangre pueden recogerse en tubos estériles para preparación de suero o tubos separadores de suero (serum separator tubes, SST) para la preparación del suero.
- Conservación de las Muestras: Las muestras de suero pueden conservarse a 2-8 °C durante un máximo de 15 días, o congeladas a -20 °C durante un máximo de 27 días o a -80 °C durante un máximo de 4 años.
- Etiquetado de las Muestras: Las muestras deberán etiquetarse claramente según las prácticas aprobadas del centro.

8. Procedimiento

8.1 Ajuste del instrumento y programación de análisis

Los ajustes pueden variar con los diferentes instrumentos y software. En general, deberá hacer lo siguiente: Ajuste el software del lector de placas para recopilar datos en el modo Vmean. Consulte el manual del software para determinar los ajustes adecuados para garantizar que el valor calculado sea la tasa media del cambio de la densidad óptica de todos los puntos de datos recogidos. Ajuste el intervalo de lecturas del detector al mínimo permitido por el software y el instrumento sobre el período de 40 minutos de la prueba. Los ajustes de longitud de onda del software deberán ser de 405 nm menos la señal de fondo a 490 nm. Se recomienda usar ambas longitudes de onda, pero si no está disponible la lectura dual de longitudes de onda, leer la prueba a 405 nm y examine la curva cinética de cada muestra de paciente para buscar signos de interferencia (consulte la sección 9.0 para obtener más detalles). La temperatura de incubación debe ajustarse a 37 °C. Ajuste la mezcla y la agitación de la placa para que se lleven a cabo durante 5-10 segundos antes del comienzo de la lectura. Seleccione la configuración del ajuste de la curva a «lineal/lineal» o equivalente. La lectura debe comenzar sin ningún tiempo de demora.

8.2 Preparación del patrón de glucano suministrado en el kit

- Disuelva un frasco del patrón de glucano con el volumen de LRW indicado en el frasco, para obtener una solución de 100 µg/ml. Mezcle en una agitadora de vórtex durante al menos 30 segundos a velocidad de media a media alta.
- Transfiera 5 µl de la muestra de suero a cada uno de los pocillos designados (UK) al menos por duplicado. Repita el proceso con cada muestra de suero.
- Añada 20 µl de la solución alcalina de pretratamiento a cada pocillo que contenga suero. Asegúrese de que el suero y las gotas de pretratamiento entren en contacto entre sí.
- Nota: Los pasos b y c pueden realizarse en orden inverso de acuerdo con las preferencias del técnico.
- Nota: Para evitar la contaminación accidental, vuelva a poner la tapa en la microplaca después de añadir las muestras y los reactivos a los pocillos.
- Agite la placa durante 5-10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos (se puede utilizar la función de agitación de placas del lector) y, a continuación, incubela durante 10 minutos a 37 °C en el lector de placas de incubación.

8.6 Reconstitución del reactivo Fungitell®

Nota: Esto puede llevarse a cabo cómodamente mientras la incubación del pretratamiento está en curso. La uniformidad del desarrollo temporal de la reconstitución mejorará la reproducibilidad, ya que la reacción del Fungitell® empieza tras la reconstitución, aunque sea a baja concentración.

Reconstituya un frasco del reactivo Fungitell® añadiendo 2,8 ml de LRW y, a continuación, añadiendo 2,8 ml de tampón de reconstitución Pyrosol utilizando la pipeta de 1000 µl. Cubra el frasco con Parafilm usando el lado del Parafilm que estaba frente al revestimiento de papel. Dé vueltas suavemente al frasco para disolver totalmente el contenido; no mezcle este en una agitadora de vórtex.

Al final de la incubación del pretratamiento del suero (sección 8.5 d), retire la placa del lector de placas de incubación y añada los patrones y los controles negativos a la placa. Pauta de concentración del patrón recomendada:

- Añada 25 µl de LRW a los pocillos G2 y G3.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 6,25 µg/ml a los pocillos F2 y F3, etiquetados como 31,25 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 12,5 µg/ml a los pocillos E2 y E3, etiquetados como 62,5 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 25 µg/ml a los pocillos D2 y D3, etiquetados como 125 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 50 µg/ml a los pocillos C2 y C3, etiquetados como 250 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 100 µg/ml a los pocillos B2 y B3, etiquetados como 500 µg/ml.

8.7 Adición de los controles negativos y los patrones de glucano

Al final de la incubación del pretratamiento del suero (sección 8.5 d), retire la placa del lector de placas de incubación y añada los patrones y los controles negativos a la placa. Pauta de concentración del patrón recomendada:

- Añada 25 µl de LRW a los pocillos G2 y G3.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 6,25 µg/ml a los pocillos F2 y F3, etiquetados como 31,25 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 12,5 µg/ml a los pocillos E2 y E3, etiquetados como 62,5 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 25 µg/ml a los pocillos D2 y D3, etiquetados como 125 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 50 µg/ml a los pocillos C2 y C3, etiquetados como 250 µg/ml.
- Añada 25 µl de la solución patrón a 100 µg/ml a los pocillos B2 y B3, etiquetados como 500 µg/ml.

a. Añada 100 µl de reactivo Fungitell® a cada pocillo (con controles negativos, patrones y muestras) utilizando la pipeta de repetición.

8.8 Adición del reactivo Fungitell® y procedimiento de incubación de la placa

- Añada 100 µl de reactivo Fungitell® a cada pocillo (con controles negativos, patrones y muestras) utilizando la pipeta de repetición.

8.4 Configuración de la placa de microtitulación

Configure la disposición de la placa de microtitulación en el software, con los patrones (Std), los controles negativos (Neg) y 21 muestras (Spl). Se recomienda la siguiente disposición:

	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												

Introduzca las concentraciones del patrón en los ajustes del software como 500, 250, 125, 62,5 y 31 pg/ml, respectivamente.

- b. Inserte la placa en el lector de microplacas (atemperado a 37 °C), retire la tapa y agite durante 5-10 segundos. Si no hay disponible una función de agitación de placas con el lector de microplacas, se puede utilizar un agitador de microplacas externo.

Obtenga la lectura de la placa **sin la tapa** a 405 nm menos 490 nm, durante 40 minutos a 37 °C. Nota: Si el instrumento no deja tiempo para retirar la tapa entre la agitación y la lectura, agite con la tapa retirada para asegurarse de que la lectura se lleve a cabo sin la tapa puesta.

9. Calcule los resultados

Obtenga los datos y lleve a cabo el análisis de la forma siguiente: Examine los gráficos cinéticos de las muestras analíticas y compruebe los patrones que no muestren un aumento gradual comparable a los de los patrones. invalide los gráficos que indiquen interferencia óptica (p. ej., los patrones cinéticos que no sigan los de los patrones). Calcule la tasa media del cambio de la densidad óptica (miliunidades de absorbancia por minuto) correspondiente a todos los puntos entre 0 y 40 minutos (esto lo hace el software). Interpole las concentraciones de (1→3)-β-D-glucano de las muestras de la curva patrón (esto lo hace el software).

10. Control de calidad

- El coeficiente de correlación (*r*) de la curva patrón (lineal frente a lineal) deberá ser $\geq 0,980$.
- Los pocillos con 25 µl de LRW son los controles negativos. Los controles negativos deberán tener valores de tasa (p. ej., miliunidades de absorbancia por minuto) inferiores al 50 % del patrón más bajo. Si no, el ensayo deberá repetirse utilizando todos los reactivos nuevos.
- Manipulación de muestras complejas. Si el analista observa cinéticas poco comunes al realizar la prueba sobre una muestra, como una muestra borrosa, de color anómalo o turbia (como las muy hemolizadas, las muy lipémicas o las que contengan un exceso de bilirrubina), la muestra debe diluirse con LRW y volverse a analizar. La dilución debe registrarse en el informe de resultados, multiplicando el resultado por el factor de dilución. **Por lo general, el factor de dilución se introduce en la configuración del software para la muestra, y la corrección se aplica automáticamente.**

Nota:

- Cada usuario de la prueba deberá establecer un programa de control de calidad para garantizar la capacidad en la realización de la prueba conforme a la normativa vigente en su zona.
- Se recomienda analizar muestras de control de suero (negativas, cercanas al valor límite o muy positivas) en el contexto de comprobaciones adicionales en el laboratorio y de las prácticas correctas de laboratorio. Estas no se incluyen en el kit Fungitell®.

11. Interpretación de los Resultados

RESULTADO NEGATIVO

Los valores de (1→3)-β-D-glucano <60 pg/ml se interpretan como resultados negativos.

El laboratorio que realice la prueba, deberá informar al médico que ordenó la prueba que no todas las infecciones fúngicas dan lugar a altas concentraciones de (1→3)-β-D-glucano en suero. Algunos hongos, como el género *Cryptococcus*^{3,4}, producen concentraciones muy bajas de (1→3)-β-D-glucano. No se tiene constancia de que los hongos del orden Mucorales, como *Absidia*, *Mucor* y *Rhizopus*^{1,4}, produzcan (1→3)-β-D-glucano. De manera similar, *Blastomycetes dermatitidis*, en su fase levaduriforme, produce poco (1→3)-β-D-glucano, y los pacientes de blastomicosis suelen tener concentraciones no detectables de (1→3)-β-D-glucano en el ensayo Fungitell®.

RESULTADO INDETERMINADO

Los valores entre 60 y 79 pg/ml se consideran no concluyentes. Se recomienda realizar muestreos y análisis adicionales de los sueros. Los muestreos y los análisis frecuentes mejoran la utilidad para el diagnóstico.

RESULTADO POSITIVO

Los valores de (1→3)-β-D-glucano ≥80 pg/ml se interpretan como un resultado positivo. Un resultado positivo no indica la presencia de enfermedad y deberá usarse junto a otros indicios clínicos para establecer un diagnóstico.

12. Limitaciones de la prueba

- Las localizaciones tisulares de la infección fúngica¹⁰, la encapsulación y la cantidad de (1→3)-β-D-glucano producida por ciertos hongos pueden afectar a la concentración sérica de este analito. La disminución de la capacidad para transmitir (1→3)-β-D-glucano al torrente sanguíneo puede reducir la capacidad para detectar ciertas infecciones fúngicas.
- Algunos individuos tienen altas concentraciones de (1→3)-β-D-glucano que caen dentro de la zona indeterminada. En esos casos, se recomienda realizar pruebas de vigilancia adicionales.
- La frecuencia de las pruebas de los pacientes dependerá del riesgo relativo de infección fúngica. En los pacientes de riesgo se recomienda obtener muestras al menos dos o tres veces por semana.
- Se han obtenido resultados positivos en pacientes de hemodiálisis^{19,20,38}, en personas tratadas con ciertos hemoderivados fraccionados, como la albúmina sérica y las immunoglobulinas^{23,25} y en muestras o personas expuestas a gases y esponjas quirúrgicas que contienen glucanos. Tras la exposición quirúrgica a

esponjas y gases con contenido de (1→3)-β-D-glucano, los pacientes necesitan 3-4 días para que se restablezcan las concentraciones iniciales de (1→3)-β-D-glucano en suero^{21,22}, por lo que esto debe tomarse en cuenta en la distribución temporal de la obtención de muestras en pacientes quirúrgicos.

- Las muestras obtenidas por métodos de punción en los talones o en los dedos no son aceptables, ya que se ha demostrado que la gasa empapada en alcohol usada para preparar la zona (y, potencialmente, la acumulación de sangre en la superficie de la piel) contaminan las muestras. En los estudios realizados hasta ahora no se han observado diferencias entre las muestras obtenidas mediante extracciones en vías y las obtenidas mediante venopunción^{26,27}.
- Para ver una exhaustiva revisión de los factores que contribuyen a los falsos positivos de (1→3)-β-D-glucano, consulte Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)³⁹.
- Las concentraciones de las pruebas se determinaron en adultos. Las concentraciones normales y umbral en poblaciones de lactantes y pediátricas se están investigando^{28,29}.

13. Eficacia Analítica

13.1 Umbral y valores esperados

Un estudio prospectivo multicéntrico³¹ realizado para determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo Fungitell® (consulte la prueba de comparación más abajo) mostró que los valores de betaglucano están elevados en una variedad de infecciones fúngicas. Cuando hay signos y síntomas y el valor de la concentración es de 80 pg/ml o superior, el valor predictivo de que la persona es positiva en infección fúngica va del 74,4 al 91,7 %. En ausencia de signos y síntomas y con una concentración inferior a 60 pg/ml, los valores predictivos para negativos fueron del 65,1 al 85,1 %.

13.2 Rendimiento clínico

Se realizó un estudio prospectivo multicéntrico para validar la eficacia analítica del ensayo Fungitell®³¹. La prueba se comparó con otros métodos estándar de detección (a saber, hemocultivo, examen histopatológico de muestras de biopsia y signos radiológicos) de micosis y fungemias.

Se utilizó el ensayo para analizar muestras de trescientas cincuenta y nueve (359) personas. Se obtuvo una única muestra de cada persona. Las personas de bajo riesgo incluyeron individuos aparentemente sanos y pacientes de los centros clínicos que ingresaron en los hospitales por razones diferentes a las infecciones fúngicas. La inclusión de las personas se realizó en seis centros clínicos de Estados Unidos. Cuatro de los centros clínicos realizaron el ensayo y analizaron un total de 285 muestras. ACC analizó las 359 muestras dos veces, pero solo utilizó el segundo grupo de resultados para determinar la eficacia analítica del ensayo. Los resultados del segundo grupo de análisis no fueron estadísticamente diferentes de los del primero.

• Sensibilidad Diagnóstica

En el caso de la población total de personas (359), incluidos los pacientes de criptococosis, la sensibilidad fue del 65,0 % (intervalo de confianza [CI] del 95 %: 60,1-70,0 %) (Tabla 1).

• Especificidad Diagnóstica

La especificidad fue del 81,1 % (CI 77,1-85,2 %). Al analizar a los 170 sujetos negativos para infección fúngica y personas aparentemente sanas, la especificidad del ensayo fue del 86,5 % (CI 82,8-90,1 %). Cuando se incluyó a las otras 26 personas que dieron negativo en infección fúngica pero tenían otras enfermedades, se observó una especificidad del 81,1 % (CI 77,1-85,2 %).

Tabla 1 Resultados de las pruebas de ACC a la concentración umbral de 60-80 pg/ml por centro

Centro	Probado/probable Sensibilidad >=80 pg/ml		Especificidad <60 pg/ml		Dudoso 60-<X>-80	Total		
	Pos/ Clin. Pos	Sensibilidad	Valor Predictivo positivo	Neg/ Clin. Neg.	Especificidad	Valor predictivo 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	—	0/0	—	0,0	0	1
Total	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Cuando los resultados obtenidos por ACC (359 muestras) y por los centros clínicos (285 muestras) se comparan con el diagnóstico clínico, la sensibilidad es del 64,3 % (CI de 58,8-69,9 %) en el caso de ACC y del 61,5 % (CI de 55,9-67,2 %) en el de los centros. La especificidad es del 86,6 % (CI de 82,7-90,6 %) en el caso de ACC, frente al 79,6 % (CI de 74,9-84,3 %) en el de los centros.

Candidiasis

En el estudio prospectivo hubo 107 personas a las que se les diagnosticó candidiasis con seguridad. 83 de los 107 fueron positivos en el ensayo Fungitell®.

Se suministraron 175 muestras de archivos de candidiasis a Associates of Cape Cod, Inc., de las cuales 145 dieron positivo en el ensayo.

Aspergilosis

Un total de 10 sujetos fueron positivos en aspergilosis. 8 de los 10 fueron positivos en el ensayo.

Fusariosis

Tres sujetos fueron positivos en fusariosis. 2 de 3 fueron positivos en el ensayo.

Tratamiento con antifúngicos

La presencia o ausencia de tratamiento con antifúngicos no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la sensibilidad del ensayo. 118 fueron demostrados positivos para infección fúngica invasiva y recibían terapia antifúngica. 82 fueron positivos en el ensayo (sensibilidad 69,5 %; CI 61,2-77,8 %). Además, veinticuatro (24) sujetos se demostraron positivos, pero sin terapia antifúngica. 18 fueron positivos en el ensayo (sensibilidad 75 %; CI 57,7 %-92,3 %).

13.3 Correlaciones de las pruebas

Cuatro de los centros clínicos analizaron un total de 285 muestras. Los resultados de las pruebas de los centros correlacionaron cuantitativamente al 96,4 % con los resultados de Associates of Cape Cod, Inc. Las correlaciones de Associates of Cape Cod, Inc., con los diferentes centros de análisis fueron del 90,6 al 99,2 %.

13.4 Precisión

Se evaluó la precisión (es decir, repetibilidad y reproducibilidad) del ensayo Fungitell® usando diez (10) muestras diferentes que se analizaron en tres centros diferentes en tres días diferentes. La variación intra-ensayo fue del 0,9 al 28,9 % y sirvió como medida de repetibilidad. La variación entre ensayos fue del 3,9 al 23,8 % y sirvió como medida de reproducibilidad. Las cuatro (4) muestras negativas se excluyeron de ambos análisis.

13.5 Intervalo de medición y linealidad

Los resultados se expresan en pg/ml de suero, van desde no detectable (<31 pg/ml) a >500 pg/ml y son imprimidos por el software o leídos a partir de la curva patrón. Los valores precisos superiores a 500 pg/ml requieren que la muestra se diluya con agua con reactivo LAL y se vuelva a analizar. Como se indica en la sección Control de calidad, el coeficiente de correlación (*r*) de la curva patrón (lineal frente a lineal) que cubre el rango de medición del ensayo Fungitell® debe ser ≥0,980 y los controles negativos deben tener valores de tasa (p. ej. unidades de miliabsorbancia por minuto) menores al 50 % del patrón más bajo. Si no, el ensayo deberá repetirse utilizando todos los reactivos nuevos.

13.6 Sustancias interferentes

Las siguientes condiciones de las muestras pueden interferir en la obtención de resultados precisos con el ensayo Fungitell®:

- Las muestras turbias o de color anómalo, como las muy hemolizadas, las muy lipémicas o las que contengan un exceso de bilirrubina, pueden producir interferencias ópticas en el ensayo. Si se analizan dichas muestras, los resultados obtenidos deberán examinarse para comprobar si presentan indicios de interferencia óptica o patrones cinéticos inhabituales.
- Las altas concentraciones de inmunoglobulina G, como las que pueden haber en el suero debido a un mieloma múltiple, pueden producir precipitación en la mezcla de reacción tras la adición de Fungitell® al suero pretratado³⁰.
- En el momento de la redacción de este documento, no se ha descrito ningún factor G activador (elemento de detección de (1→3)-β-glucano) del reactivo Fungitell® aparte del (1→3)-β-glucano. En algunos estudios, donde se ha informado de reactividad cruzada, el tratamiento del material activador supuesto con (1→3)-β-glucanasa purificada ha eliminado la señal, lo que demuestra que la activación observada se había debido a (1→3)-β-glucano contaminante¹⁵. La contaminación por serina proteasa también puede provocar la liberación de para-nitroanilina en las mezclas de reacción de Fungitell®, pero estas son inactivadas como parte del proceso de pretratamiento.

14. Metaanálisis

También se han publicado numerosos estudios revisados por expertos sobre el tema del uso de suero a base de (1→3)-β-D-glucano en el diagnóstico de enfermedades fúngicas invasivas; dichos estudios incluyen metaanálisis de la eficacia diagnóstica^{32,33,34,35,36,37}.

15. Leyenda de símbolos

	Fecha de Caducidad		Consulte las Instrucciones de Uso
	Contiene material suficiente para <N> pruebas		Representante autorizado de la UE
	LOT		Marcado CE

IVD Producto Sanitario para Diagnóstico In Vitro

Rx only Solamente para uso por prescripción

REF Número de Catálogo

Precaución

Límites de Temperatura

Mantener alejado de la luz solar

Fabricante

Importador

Representante autorizado suizo

MedEnvoy Switzerland
Gottardstrasse 28, 6302 Zug, Suiza

Importador

MedEnvoy Global B.V.
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123 2595 AM The Hague, Países Bajos

Patrocinador australiano:

Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park
201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Australia

Nota: Los incidentes graves relacionados con el dispositivo deberán notificarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado Miembro en el que esté establecido el usuario o el paciente.

16. Representantes autorizados/importador

EC REP Emergo Europe, Westervoortsedijk 60, 6827 AT Arnhem, Países Bajos

CH REP

Representante autorizado suizo

Importador

MedEnvoy Global B.V.
Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123 2595 AM The Hague, Países Bajos

18. Historial de revisiones

Rev. 0 a 11: Cambio de pruebas por triplicado a pruebas por duplicado. Sustituido agua de grado reactiva por agua con reactivo LAL. Se han combinado los componentes de cloruro de potasio y hidróxido de potasio en la solución alcalina de pretratamiento. Se ha retirado la microplaca del kit y se ofrece como artículo necesario pero no suministrado. Se ha cambiado el representante para la CE y se ha añadido un patrocinador para Australia. Pequeñasclaraciones, formateado, añadido de símbolos y sustancias interferentes adicionales.

Rev. 12: Se eliminó el representante para la CE de Emergo Europe.

Rev. 13: Se ha actualizado la dirección del Reino Unido y se ha eliminado ACC Europe GmbH del apartado 17. Se han corregido errores gramaticales menores. Se han actualizado los símbolos utilizados. Se ha añadido el nombre y la dirección del CE-REP, importador suizo y CH-REP.

19. Referencias

1. Olabasi, Z., Paezick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in betaglucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. Medical Mycology 44: 267-272.
2. 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. Infect. Dis. 46: 1813-1821.
3. 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.
4. Binder, U., Maurer, E., and Lass-Florl, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Lin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl 6): 60-66.
5. Giroud, G., Lachance, C., and Pelleter, R. 2007. Observations of (1→3)-β-D-Glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by Histoplasma or Blastomycetes. J. Med. Mycology 56: 1001-1002.
6. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: emerging challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999: 1247-261.
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., Yasuoka, 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 fever episodes. Lancet. 345: 174-178.
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. Infectious Dis. 2002; 4 (Suppl 1): 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. Litvinsev, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhong, S.X., Grunrich, 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., Martinuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, 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: 1-32.
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 antifungal 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 glucans 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 hemodialysis 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, Y., 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., Yano, 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., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Coanour, 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 #M1-168.*
23. Heik J, Wagner DJ. β -D-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:118-22.
24. 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.
25. 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.
26. Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Loskova, M., Winterova, J., Timulsina, S., Rodriguez, I., and Mayer, J. Difficulties in using 1,3- β -D-gluc 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. Goudji, L., Kongo, G., Dasol, L., Imstouren, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)- β -D-glucan levels in candidaemia infections in the critically ill neonate. *J. of Maternal-Fetal and Neonatal Med.* 26: 44-48.
30. Issa, N.C., Kao, S., Lynch, R.C., Guy, C., Hammann, S.P., Baden, L.R., Ghobrial, 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., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, 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, D.E., Vouloumanou, E.K., Tsiorio, F., Michalopoulos, A., Rafailidis, P.I., Falagas, M.E. 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 Fungi 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 (ECL-3). *Clin Infect Dis.* 2012; 54:633-43.
35. Onishi, A.I., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., Morimori, 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, D.E., Qu, J.M., Korbila, I.P., Zhu, Y.G., Vasiliou, V.A., Falagas, M.E. Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19:39-49.
37. He S1, Hang JP2, Zhang L2, Wang F2, Zhang DC3, Gong FH4 A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of He S1, Hang JP2, Zhang L2, Wang F2, Zhang DC3, Gong FH4 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., Vilas, 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. Fungi* (Basel) 2020 Dec 29;7(1):14.

Para obtener más referencias, consulte nuestro sitio web Fungitell.com

Se puede descargar un Esquema de guía rápida del procedimiento del test en el sitio web Fungitell.com, en: https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf