

Test pour le (1→3)- β -D-glucane sérique

TEST FUNGITELL®

Notice d'utilisation



Téléphone : (508) 540-3444
Numéro vert : (888) 395-2221
Fax : (508) 540-8880
Assistance technique : (800) 848-3248
Service client : (800) 525-8378

PN001268-fr Rév13 REF FT001 2024-09-05



Visiter www.accusa.com pour obtenir la notice d'utilisation dans votre langue.
Ce produit est destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro* et professionnelle uniquement.

1. Utilisation prévue

Le test Fungitell® est un test colorimétrique basé sur un zymogène de protéase pour une détection qualitative du (1→3)- β -D-glucane dans le sérum de patients ayant des symptômes d'infection fongique invasive ou des pathologies médicales les prédisposant à une infection fongique invasive. La concentration du sérum en (1→3)- β -D-glucane, un composant principal de la paroi cellulaire de plusieurs champignons dont l'importance médicale est reconnue¹, pourrait aider à diagnostiquer des mycoses profondes et des fongémies². Un test positif n'indique pas le genre de champignon en cause dans l'infection.

Les titres du (1→3)- β -D-glucane devraient être utilisés conjointement avec d'autres méthodes diagnostiques, telles que la culture microbiologique, l'examen histologique d'échantillons de biopsie et de radiographies.

Important

Fournir cette information au médecin demandeur : Certains champignons, du genre *Cryptococcus* qui produisent de très faibles taux de (1→3)- β -D-glucane, pourraient ne pas conduire à un taux de (1→3)- β -D-glucane sérique assez élevé pour être détectés par le test^{3,4}. Les infections dues à des champignons d'ordre Mucorales tels que *Absidia*, le mucor et le rhizopus^{5,6}, qui ne sont pas connus pour produire du (1→3)- β -D-glucane, produisent également de faibles titres de (1→3)- β -D-glucane sérique. De plus, dans la phase levure le *Blastomyces dermatitidis* produit peu de (1→3)- β -D-glucane et pourrait ne pas être détecté par le test⁷.

Inclure cela dans les rapports de résultats du test Fungitell®.

2. Résumé et explication

Il y a une croissance de l'incidence des infections fongiques due à des infections opportunistes, notamment chez les patients immunodéficients^{8,9}. Les maladies fongiques invasives, tout comme les infections opportunistes, sont fréquentes parmi les malades du SIDA et ceux présentant des hématopathies malignes et compte pour une nombre croissant des infections nosocomiales, notamment chez les bénéficiaires d'une transplantation d'organe et autres patients recevant des traitements immunsupresseurs^{9,10}. Plusieurs maladies fongiques sont contractées par l'inhalation de spores fongiques venant du sol, de détritus végétaux, de systèmes de traitement de l'air et des surfaces exposées. Certains champignons opportunistes sont présents dans et sur la peau humaine, le tube digestif et les muqueuses^{11,12}. Le diagnostic des mycoses invasives et des fongémies se fait en général sur un diagnostic ou sur des techniques radiologiques non spécifiques. Des marqueurs biologiques d'infection fongique ont été récemment ajoutés aux méthodes diagnostiques actuellement disponibles².

Les organismes pathogènes fongiques opportunistes inclus le *Candida spp.*, l'*Aspergillus spp.*, le *Fusarium spp.*, le *Trichosporon spp.*, le *Saccharomyces cerevisiae*, l'*Acremonium spp.*, le *Coccidioides immitis*, l'*Histoplasma capsulatum*, le *Sporothrix schenckii*, l'*Exserohilum rostratum* et le *Pneumocystis jirovecii*. Le (1→3)- β -D-glucane produit par ces organismes, et autres, peut être détecté par le test Fungitell®^{1,8,13,14}.

3. Principes de la procédure

Le test Fungitell® mesure la quantité de (1→3)- β -D-glucane. Le test se base sur une modification de la trajectoire du lysat d'amibocytes de *limule* (LAL)^{15,16,17,18}, Figure 1. Le réactif Fungitell® est modifié pour éliminer toute réactivité d'endotoxine bactérienne et, ainsi, pour réagir seulement avec le (1→3)- β -D-glucane, par le biais de la partie de la voie médiée par le facteur G. Le (1→3)- β -D-glucane active le facteur G, un zymogène de sérine protéase. Le facteur G active transforme l'enzyme pro-coagulante inactive en une enzyme coagulante active, qui à son tour coupe la para-nitroaniline (pNA) du substrat peptidique chromogène, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, créant un chromophore, para-nitroaniline, qui absorbe à 405 nm. Le test cinétique du Fungitell®, décrit ci-dessous, se base sur la détermination du taux d'augmentation de la densité optique produite par un échantillon. Ce taux est interprété en fonction d'une courbe d'étalement produisant des estimations de concentration de (1→3)- β -D-glucane dans l'échantillon.

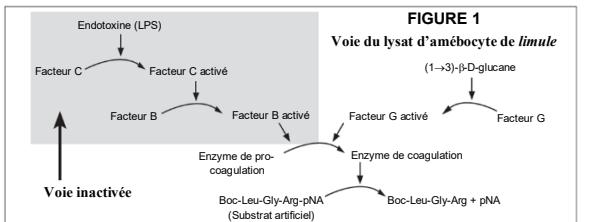


FIGURE 1
Voie du lysat d'amibocyte de limule

(1→3)- β -D-glucane

Endotoxine (LPS)
Facteur C activé
Facteur B activé
Enzyme de pro-coagulation
Boc-Leu-Gly-Arg-pNA (Substrat artificiel)
Facteur G activé
Facteur G
Enzyme de coagulation
Boc-Leu-Gly-Arg + pNA

4. Matériaux fournis avec le kit Fungitell®

Le kit Fungitell® est destiné à être utilisé pour le diagnostic *in vitro*. Les matériaux suivants fournis avec chaque kit suffisent pour tester 110 puits sur deux plaques de microtitration (55 puits chacune) :

- Le réactif Fungitell®, un LAL spécifique au (1→3)- β -D-glucane lyophilisé (deux flacons).
- Le réactif Fungitell® se compose de lysat d'amibocyte de limule et de substrat colorimétrique Boc-Leu-Gly-Arg-pNA. Il ne contient pas de protéines humaines ou mammifères.
- Tampon de reconstitution Pyrosol® (deux flacons). D'autres flacons de tampon de reconstitution Pyrosol (n° de catalogue BC051) peuvent être achetés séparément. Il est composé de tampon Tris de 0,2 M.
- Étalon de glucane, (1→3)- β -D-glucane lyophilisé de Pachyman (deux flacons). Le volume d'eau de réactif à ajouter est indiqué sur l'étiquette du flacon. Il est équilibré par rapport à l'étalon de référence interne.
- Eau de réactif LAL (LRW) (deux flacons)
- Remarque :** 20 ml d'eau de grade réactif (RGW) et de LRW dans des flacons en verre sont équivalents.
- Solution alcaline de prétraitement (deux flacons) qui contient du KOH à 0,125 M et du KCl à 0,6 M

Tous ceux-ci sauf l'étalon, ne devraient pas interférer avec les niveaux de (1→3)- β -D-glucane.

5. Matériel nécessaire mais non fourni

Tout le matériel doit être exempt de glucane interférant.

- Embouts de pipette* (250 μ L - n° de catalogue PPT25, 1 000 μ L - n° de catalogue PPT10)
- Des pipettes pouvant fournir des volumes de 5-25 μ L et 100-1 000 μ L
- Une pipette à répétition avec embouts de seringue pouvant fourrir 100 μ L
- Des tubes à essai* pour la préparation des séries d'étaillons (courbe de calibrage) et la combinaison des réactifs de traitement du sérum. (12 x 75 mm - n° de catalogue TB240 ou 13 x 100 mm - n° de catalogue TB013)
- Lecteur de plaque d'incubation (37 °C) capable de lire à 405 nm (de préférence capable d'une surveillance à double longueur d'ondes à 405 et 490 nm) avec une plage dynamique allant jusqu'à 2,0 unités d'absorbance au moins, couplé avec un logiciel informatique approprié de test cinétique.
- Tubes stériles exempts de glucane pour l'aliquotage des échantillons. Des tubes certifiés sans RNase, DNase et pyrogène peuvent être utilisés.
- Parafilm®
- Microplaques* à 96 puits

Remarque : Le test Fungitell® a été validé avec des plaques présentant les caractéristiques suivantes : en polystyrène, stériles, non revêtues, à fond plat, sans bêta-glucane interférant (selon les spécifications d'ACC) et emballées séparément.

* Ces produits, fournis par Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), sont certifiés sans glucanes interférants.

6. Conservation des réactifs

- Conserver tous les réactifs, tels que fourmis, entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière.
- Le réactif reconstitué Fungitell® doit être conservé entre 2 et 8 °C et être utilisé dans les 2 heures qui suivent. Le réactif reconstitué Fungitell® peut également être congelé à -20 °C pendant au plus 20 jours et utilisé après décongélation.

7. Mises en garde et précautions

- Ne pas pipeter pas à la bouche. Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
- Respecter les consignes de sécurité opérationnelles et locales.
- Porter des gants de protection lors de la manipulation d'échantillons biologiques qui peuvent être infectieux ou dangereux. Les mains gantées doivent être considérées contaminées en tout temps ; tenir les mains gantées éloignées des yeux, de la bouche et du nez. Porter des lunettes de protection et un masque chirurgical s'il y a une possibilité de contamination par l'aérosol.
- Remarque :** Ne pas utiliser des kits dont le contenu est endommagé.
- Élimination : Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est régie par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités ou les entreprises de gestion des déchets locales pour obtenir des conseils pour l'élimination des déchets dangereux.

• Les fiches de données de sécurité pour tous les composants du kit Fungitell® peuvent être téléchargées depuis le site Web d'ACC : www.accusa.com.

7.1 Précautions procédurales

Le test Fungitell® nécessite qu'une attention rigoureuse soit portée à l'environnement et à la technique du test. Une formation complète du technicien à la méthode de test et à éviter la contamination est essentielle pour l'efficacité du test.

- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire conformément aux réglementations locales. Ce test est sensible à la contamination et au pipetage inexact.
- Créer un environnement propre pour réaliser le test.
- Noter toute contamination par des particules de glucane ou fongiques issues du corps humain, des vêtements, des contenants, de l'eau et des poussières en suspension dans l'air, pourrait interférer avec le test Fungitell®.
- Sources de contamination possibles : le matériel contenant de la cellulose tel que la gaze, les serviettes en papier et le carton, les pipettes en verre avec bouchons en coton et les embouts de pipette avec filtres en cellulose. La gaze et les éponges chirurgicales peuvent également libérer des quantités élevées de (1→3)- β -D-glucane^{21,22}. Pour d'autres sources de contamination liées au patient, voir la section Limites du test.
- Ne pas utiliser le matériel après sa date d'expiration.

7.2 Manipulation des échantillons

- Le prélèvement sanguin et la préparation du sérum doivent être effectués conformément aux réglementations locales en vigueur. Collecte des échantillons : Les échantillons de sang peuvent être recueillis dans des tubes stériles de préparation de sérum ou dans des tubes séparateurs de sérum (SST) pour la préparation du sérum.
- Conservation des échantillons : Les échantillons de sérum peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 15 jours maximum, ou être congelés à -20 °C pendant 27 jours maximum ou à -80 °C pendant 4 ans maximum.
- Étiquetage des échantillons : Les échantillons doivent être clairement identifiés conformément aux bonnes pratiques de l'institution.

8. Procédure

8.1 Réglage de l'instrument et programmation du test

Les paramètres pourraient varier selon les instruments et les logiciels. En général, ce qui suit s'applique : Configurer le logiciel du lecteur de plaque pour recueillir les données en mode Vmean. Consulter le manuel du logiciel pour les paramètres appropriés afin de vous assurer que la valeur calculée est le taux moyen de changement de la densité optique pour tous les points de données recueillis. Régler l'intervalle de lecture du détecteur au minimum autorisé par le logiciel ou l'instrument durant les 40 minutes du test. Les réglages de la longueur d'ondes du logiciel devraient être à 405 nm moins le fond à 490 nm. Il est recommandé d'utiliser les deux longueurs d'onde, mais si la lecture à double longueur d'onde n'est pas disponible, lire le test à 405 nm et examiner chaque courbe cinétique de l'échantillon du patient pour détecter les signes d'interférence (voir section 9.0 pour plus de détails). La température d'incubation doit être à 37 °C. Configurer de sorte à commencer le mélange ou l'agitation de la plaque 5 à 10 secondes avant le début de la lecture. Sélectionner « linear/linear » (linéaire/linéaire) ou l'équivalent pour l'ajustement du paramétrage de la courbe. La lecture devrait commencer sans décalage.

8.2 Préparation de l'échantillon de glucane fourni dans le kit

- Dissoudre un flacon d'échantillon de glucane avec le volume de LRW indiqué sur le flacon, pour obtenir une solution de 100 pg/ml. Vortexer pendant au moins 30 secondes d'une vitesse moyenne à une vitesse moyenne élevée pour reconstituer l'échantillon (solution 1). La solution de glucane doit être conservée entre 2 et 8 °C et utilisée dans les trois jours. Les étapes b à e ci-dessous donnent un exemple de préparation de schéma d'une courbe d'étalement.
- Préparer une solution échantillon de 50 pg/ml (solution 2) en mélangeant 500 μ L de LRW et 500 μ L de solution 1 dans un tube sans glucane (solution 2). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
- Préparer une solution échantillon de 25 pg/ml (solution 3) en mélangeant 500 μ L de LRW et 500 μ L de solution 2 dans un tube sans glucane (solution 3). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
- Préparer une solution échantillon de 12,5 pg/ml (solution 4) en mélangeant 500 μ L de LRW et 500 μ L de solution 3 dans un tube sans glucane (solution 4). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
- Préparer une solution échantillon de 6,25 pg/ml (solution 5) en mélangeant 500 μ L de LRW et 500 μ L de solution 4 dans un tube sans glucane (solution 5). Vortexer pendant au moins 10 secondes.

8.3 Ouverture de la solution alcaline de prétraitement

La solution alcaline de prétraitement convertit les glucanes à triple hélice en glucanes monocaténaires^{17,18}, qui sont plus réactifs dans le test. En outre, le pH aclaré sera à inactiver les inhibiteurs et les protéases sériques susceptibles d'interférer avec le test.²⁴

Jeter le flacon (en respectant les procédures du laboratoire) sauf s'il doit être utilisé dans un test subseqüent; dans ce cas, le recouvrir avec du Parafilm, en utilisant le côté qui est face au support papier.

8.4 Configuration de la plaque de microtitration

Configurer la disposition de la plaque de microtitration dans le logiciel avec les étaillons (Std), les contrôles négatifs (Neg) et 21 échantillons (Spl). La disposition suivante est recommandée :

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	Nég	Nég	SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21		
H											

Entrer les concentrations des étaillons dans les paramètres du logiciel respectivement, 500, 250, 125, 62,5 et 31 pg/ml.

Noter que les concentrations des étaillons entrées sont cinq fois plus élevées que celles préparées à la section 8.2 ci-dessus. Cela est dû au fait que le volume d'étaillon utilisé dans le test est de 25 μ L par puits, soit cinq fois le volume de l'échantillon de sérum utilisé (voir la section 8.5 b. ci-dessous). Ainsi, l'échantillon de sérum est effectivement dilué cinq fois par rapport à l'étaillon. La multiplication des concentrations des étaillons par cinq compense cette dilution.

Remarque : Les puits extérieurs peuvent être utilisés, s'il a été prouvé que leur efficacité équivaut à celle des puits internes.

Remarque : Les contrôles négatifs ne sont pas utilisés dans la courbe d'étalement.

8.5 Ajout de sérum et de solution alcaline de prétraitement

- Décongeler les échantillons de sérum congelés à température ambiante. Bien vortexer tous les échantillons en tourbillonnant pendant au moins 30 secondes d'une vitesse moyenne à une vitesse moyenne élevée.
- Transférer 5 μ L de l'échantillon de sérum dans chacun des puits indiqués (Uk) au moins en double. Répéter l'opération pour chaque échantillon de sérum.
- Ajouter 20 μ L de la solution alcaline de prétraitement dans chaque puits contenant des échantillons. Assurez-vous que le sérum et les gouttelettes de prétraitement soient en contact les uns avec les autres.
- Remarque : Les étapes b et c peuvent être réalisées dans l'ordre inverse selon la préférence du technicien.
- Remarque : Pour éviter une contamination accidentelle, remettre le couvercle sur la microplaquette après avoir ajouté les échantillons et les réactifs dans les puits.
- Agiter la plaque pendant 5 à 10 secondes afin de mélanger le contenu des puits (il est possible d'utiliser la fonction agitation du lecteur de plaque) puis incuber pendant 10 minutes à 37 °C dans le lecteur de la plaque d'incubation.

8.6 Reconstitution du réactif Fungitell®

Remarque : Cela pourrait être réalisé pendant que l'incubation de prétraitement est en cours. La cohérence du temps de reconstitution améliorera la reproductibilité puisque la réaction du Fungitell® commence après la reconstitution, même si c'est à un faible niveau.

Reconstituer un flacon de réactif Fungitell® en ajoutant 2,8 ml de LRW, puis 2,8 ml de tampon de reconstitution Pyrosol en utilisant la pipette de 1 000 μ L. Couvrir le flacon avec du Parafilm en utilisant le côté qui est face au support papier. Tournoyer doucement le tube pour faire dissoudre complètement. Ne pas vortexer.

8.7 Ajout de contrôles négatifs et des étaillons de glucane

A la fin de l'incubation du prétraitement du sérum (Section 8.5 d.), retirer la plaque du lecteur de plaque d'incubation et ajouter les étaillons et les contrôles négatifs à la plaque. Modèle de concentration d'étaillon recommandée :

- Ajouter 25 μ L de LRW aux puits G2 et G3.
- Ajouter 25 μ L de la solution étaillon 5 de 6,25 pg/ml aux puits F2 et F3, étiquetés comme étant de 31,25 pg/ml.
- Ajouter 25 μ L de la solution étaillon 4 de 12,5 pg/ml aux puits E2 et E3, étiquetés comme étant de 62,5 pg/ml.
- Ajouter 25 μ L de la solution étaillon 3 de 25 pg/ml aux puits D2 et D3, étiquetés comme étant de 125 pg/ml.
- Ajouter 25 μ L de la solution étaillon 2 de 50 pg/ml aux puits C2 et C3, étiquetés comme étant de 250 pg/ml.
- Ajouter 25 μ L de la solution étaillon 1 de 100 pg/ml aux puits B2 et B3, étiquetés comme étant de 500 pg/ml.

8.8 Ajout du réactif Fungitell® et procédure d'incubation de la plaque

- Ajouter 100 μ L de réactif Fungitell® à chaque puits (contenant des contrôles négatifs, des étaillons et des échantillons) en utilisant la pipette à répétition.

b. Insérer la plaque dans le lecteur de microplaques (équilibré à 37 °C), retirer le couvercle et agitez pendant 5 - 10 secondes. Si la fonction d'agitation de la plaque n'est pas disponible avec le lecteur de microplaques, il est possible d'utiliser un agitateur de microplaques externe.

Lire la plaque **sans le couvercle** à 405 nm moins 490 nm, pendant 40 minutes à 37 °C. Remarque : Si l'instrument ne laisse pas le temps d'enlever le couvercle entre l'agitation et la lecture, agiter sans le couvercle pour garantir une lecture sans couvercle.

9. Calculer les résultats

Recueillir et analyser les données de la manière suivante : Examiner les tracés cinétiques des échantillons de test et vérifier s'ils présentent des caractéristiques autres qu'une augmentation régulière comparable à ceux des étalons. Des tracés invalides indiquant une interférence optique (ex: leurs schémas cinétiques ne correspondent pas à ceux des étalons). Calculer le taux moyen de changement de la densité optique (milli-unités d'absorbance par minute) pour tous les points entre 0 et 40 minutes (réalisé par le logiciel). Interpoler les concentrations de l'échantillon (1→3)- β -D-glucan à partir de la courbe standard (réalisée par le logiciel).

10. Contrôle qualité

- Le coefficient de corrélation (r) de la courbe d'étalonnage (linéaire vs linéaire) devrait être $\geq 0,980$.
- Les puces avec 25 μL de LRW sont les contrôles négatifs. Les contrôles négatifs doivent avoir des valeurs de taux (par exemple milli-unités d'absorbance par minute) inférieures à 50 % du taux de l'étalon le plus faible. Si ce n'est pas le cas, le test devrait être répété avec de nouveaux réactifs.
- Manipulation d'échantillons complexes. Si l'analyste observe une cinétique inhabituelle dans le test d'un échantillon, par exemple un échantillon trouble ou de couleur inhabituelle (comme ceux fortement hémolysés, lipémiques ou contenant un excès de bilirubine), l'échantillon doit être dilué avec de la LRW et testé de nouveau. La dilution doit être comptabilisée dans le rapport des résultats en multipliant le résultat par le facteur de dilution. **Le facteur de dilution est généralement entré dans la configuration du logiciel pour l'échantillon et la correction est appliquée de manière automatique.**

Remarque :

- Tout utilisateur du test doit établir un programme de contrôle qualité pour s'assurer que le test soit effectué de manière compétente, dans le respect de la réglementation applicable dans sa localité.
- Il est recommandé de tester des échantillons sériques de contrôle (négatifs, proches de la valeur limite ou fortement positifs) dans le cadre de vérifications supplémentaires du laboratoire et des bonnes pratiques de laboratoire. Ceux-ci ne sont pas inclus dans le kit Fungitell®.

11. Interprétation des résultats

RÉSULTAT NÉGATIF

Les valeurs de (1→3)- β -D-glucane < 60 pg/ml sont interprétées comme des résultats négatifs.

Le laboratoire qui effectue le test doit informer le médecin traitant que toutes les infections fongiques n'entraînent pas des taux élevés de sérum (1→3)- β -D-glucane. Certains champignons, du genre *Cryptococcus*^{1,4}, produisent un taux très faible de (1→3)- β -D-glucane. Les mucorales, tel que *l'absidia*, le *Mucor* et le *Rhizopus*^{1,4} ne sont pas connus pour produire du (1→3)- β -D-glucane. De même, *Blastomycetes dermatitidis*, dans sa phase de levure, produit très peu de (1→3)- β -D-glucane, et les patients souffrant de blastomycose ont des niveaux de (1→3)- β -D-glucane indétectables par le test Fungitell®.

RÉSULTAT INDÉTERMINÉ

Les valeurs comprises entre 60 et 79 pg/ml sont considérées comme non concluantes. Des prélèvements et des analyses supplémentaires de sérum sont recommandés. Des prélèvements et des analyses fréquents sont une meilleure aide au diagnostic.

RÉSULTAT POSITIF

Des valeurs de (1→3)- β -D-glucane ≥ 80 pg/ml sont interprétées comme un résultat positif. Un résultat positif n'indique pas la présence d'une maladie et doit être utilisé en conjonction avec d'autres bilans cliniques pour établir un diagnostic.

12. Limites du test

- Les emplacements des tissus dans une infection fongique¹⁰, l'encapsulation, et la quantité de (1→3)- β -D-glucane produite par certains champignons pourraient affecter la concentration sérique de cet analyte. La capacité réduite du (1→3)- β -D-glucane à contribuer à la circulation sanguine peut réduire la capacité à détecter certaines infections fongiques.
- Certaines personnes ont un taux élevé de (1→3)- β -D-glucane qui tombe dans la zone indéterminée. Dans ces cas, des tests de surveillance supplémentaires sont recommandés.
- La fréquence des tests dépendra du risque relatif d'infection fongique qu'ençoit le patient. Des fréquences de prélèvement d'au moins deux à trois fois par semaine sont recommandées pour les patients à risque.
- Des résultats positifs ont été observés chez les patients hémodialysés^{19,20,38}, chez les sujets traités avec certains produits sanguins fractionnés tels que l'albumine de sérum et les immunoglobulines^{22,25} et dans les échantillons ou chez les sujets

exposés à de la gaze et aux éponges chirurgicales contenant du glucane. Il faut 3 à 4 jours aux patients pour retrouver le niveau de base du sérum en (1→3)- β -D-glucane, après une exposition chirurgicale à des éponges et à des gazes contenant du (1→3)- β -D-glucane^{21,22}. En conséquence, il faudrait prendre en compte cela dans le choix du moment pour le prélèvement des patients opérés.

- Les échantillons prélevés au talon ou au doigt sont inacceptables, car il a été prouvé que la gaze imbibée d'alcool et utilisée pour préparer le site (et, potentiellement, l'accumulation sanguine de la surface de la peau) contaminé les spécimens. À ce jour, les études n'ont observé aucune différence entre les échantillons obtenus par prélèvement par ligne ou par ponction veineuse^{26,27}.
- Pour un examen complet des facteurs contribuant aux faux positifs du (1→3)- β -D-glucane, voir Finkelman, M.A., *Journal of Fungi* (2021)³⁹.
- Les niveaux de test ont été établis chez des sujets adultes. Les niveaux normaux et de seuil pour les enfants en bas âge et les enfants plus âgés sont à l'étude^{28,29}.

13. Caractéristiques de performance

13.1 Valeurs seuils et valeurs attendues

Une étude prospective multicentrique³¹ menée afin de déterminer la sensibilité et la spécificité diagnostiques du test Fungitell® (voir les tests comparatifs ci-dessous) a montré que les valeurs de bêta-glucane sont élevées dans une variété d'infections fongiques. Lorsque les signes et les symptômes sont présents à un taux de 80 pg/ml ou plus, la valeur prédictive selon laquelle le sujet est positif pour une infection fongique varie entre 74,4 et 91,7 %. En l'absence de signes et de symptômes à moins de 60 pg/ml, la valeur prédictive négative varie entre 65,1 % et 85,1 %.

13.2 Performances cliniques

Des études prospectives multicentriques pour valider les caractéristiques de performance du test Fungitell® ont été réalisées³¹. Le test a été comparé à d'autres méthodes de détection standard, (ex: hémodécoupage, examen histopathologique de biopsie et de radiographie) de mycoses et de fongémies.

Le test a été utilisé sur trois cent cinquante-neuf (359) sujets. Un échantillon unique a été obtenu pour chaque sujet. Les sujets à faible risque comprenaient des personnes apparemment en bonne santé et celles sur les sites cliniques qui étaient hospitalisées pour des raisons autres que des infections fongiques. Une accumulation de sujets a été faite sur six sites cliniques aux États-Unis. Quatre sites cliniques ont effectué le test sur un total de 285 échantillons. ACC a testé deux fois tous les 359 échantillons mais n'a utilisé que la deuxième série de résultats pour déterminer les performances du test. Les résultats de la seconde série d'analyses n'étaient pas statistiquement différents de la première série.

• Sensibilité du diagnostic

La sensibilité pour toute la population de sujets (359) y compris les patients atteints de la cryptococcose était de 65,0 % [intervalle de confiance (IC) à 95 % de 60,1 - 70,0 %] (Tableau 1).

• Spécificité du diagnostic

La spécificité était de 81,1 % (IC de 77,1 - 85,2 %). Lors de l'analyse des 170 sujets négatifs pour une infection fongique et des individus apparemment sains, la spécificité était de 86,5 % avec le test (IC de 82,8 % - 90,1 %). Une spécificité de 81,1 % (IC de 77,1 - 85,2 %) a été observée lorsqu'elles les 26 sujets testés négatifs à une infection fongique, mais ayant d'autres troubles, ont été rajoutés.

Tableau 1 Résultats du test ACC à un seuil de 60 - 80 pg/ml par site

Site	Avéré/probable Sensibilité >= 80 pg/ml		Spécificité < 60pg/ml		Équivocal 60-80	Total
	Pos/ Clin. Pos	Sensibilité	Neg/ Clin. Neg	Spécificité		
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8
6	0/1	0,0	Ne s'applique pas	0/0	Ne s'applique pas	0,0
Total	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8
					21	359

Lorsque l'on compare les résultats obtenus par ACC (359 échantillons) et par les sites cliniques (285 échantillons) au diagnostic clinique, la sensibilité est de 64,3 % (58,8 % - 69,9 % IC) pour ACC et de 61,5 % (55,9 % - 67,2 % IC) pour les sites. La spécificité est de 86,6 % (82,7 % - 90,6 % IC) pour ACC contre 79,6 % (74,9 % - 84,3 % IC) pour les sites.

Candidose

Dans cette étude prospective, 107 sujets ont reçu un diagnostic positif de candidose. 83 de ces 107 sujets étaient positifs selon le test Fungitell®.

Cent soixante-quinze échantillons de la bibliothèque de candidose ont été fournis à Associates of Cape Cod, Inc. 145 des 175 se sont avérés positifs lors du test.

Aspergillose

Au total, 10 sujets étaient positifs pour l'aspergillose. 8 des 10 étaient positifs selon le test.

Fusariose

Trois sujets étaient positifs pour la fusariose. 2 des 3 étaient positifs selon le test.

Traitement médicamenteux antifongique

La présence ou l'absence de traitement médicamenteux antifongique n'a pas eu d'effet statistiquement significatif sur la sensibilité du test. 118 sujets se sont révélés positifs pour une infection fongique invasive et sous traitement antifongique. 82 étaient positifs selon le test (sensibilité, 69,5 % ; IC de 61,2 % - 77,8 %). En outre, vingt-quatre (24) sujets se sont révélés positifs, mais ne suivait aucun traitement antifongique. 18 étaient positifs selon le test (sensibilité, 75 % ; IC de 57,7 % - 92,3 %).

13.3 Corrélations des tests

Quatre sites cliniques ont testé un total de 285 échantillons. Les résultats du test sur le site ont quantitativement corrélatifs à 96,4 % avec les résultats chez Associates of Cape Cod, Inc. Les corrélations d'Associates of Cape Cod, Inc. avec les différents sites de test qui variaient entre 90,6 et 99,2 %.

13.4 Précision

Le test Fungitell® a été évalué en termes de précision (c'est-à-dire de répétabilité et de reproductibilité) à l'aide de dix (10) échantillons différents, testés chacun par trois sites de test, trois jours différents. La variation intra-test allait de 0,9 % à 28,9 % et a servi de mesure de répétabilité. La variation inter-test allait de 3,9 % à 23,8 % et a servi de mesure de reproductibilité. Les quatre (4) échantillons négatifs ont été exclus des deux analyses.

13.5 Plage de mesure et linéarité

Les résultats sont exprimés en pg/ml de sérum et varient de non-détectable (< 31 pg/ml) à > 500 pg/ml. Ils sont imprimés par le logiciel ou lu à partir de la courbe standard. Des valeurs précises au-delà de 500 pg/ml nécessitent que l'échantillon soit dilué avec l'eau de réactif LAL et testé de nouveau. Comme indiqué dans la section Contrôle qualité, le coefficient de corrélation (r) de la courbe d'étalonnage (linéaire vs linéaire) couvrant la plage de mesure du test Fungitell® doit être $\geq 0,980$ et les contrôles négatifs doivent avoir des valeurs de taux (par exemple, milli-unités d'absorbance par minute) inférieures à 50 % du taux de l'échantillon le plus faible. Si ce n'est pas le cas, le test devrait être répété avec de nouveaux réactifs.

13.6 Substances interférentes

Les conditions d'échantillon suivantes peuvent interférer avec un résultat de test Fungitell® précis :

- Les échantillons de couleurs non attendues ou troubles, par exemple, ceux qui sont fortement hémolysés, lipémiques, ou qui contiennent un excès de bilirubine pourraient créer une interférence optique avec le test. Si de tels échantillons sont testés, les résultats du test devraient être examinés à la recherche de preuves d'interférences optiques et de schémas cinétiques inhabituels.
- Un taux élevé d'immunoglobuline G, tel qu'il pourrait exister dans le sérum à cause de mélanomes multiples, pourrait entraîner une précipitation dans le mélange réactionnel après l'ajout du Fungitell® au sérum prétraité³⁰.
- Au moment de la rédaction de la présente, aucune substance activant le facteur G (élément de détection du (1→3)- β -glucane) du réactif Fungitell® autre que le (1→3)- β -glucane n'a été décrite. Dans certaines études, où des affirmations de réactivité croisée ont été faites, le traitement de la substance d'activation supposé avec de la (1→3)- β -glucanase purifiée a éliminé le signal, démontrant que l'activation observée était due à une contamination par du (1→3)- β -glucane¹⁵. Une contamination par de la sécrine protéase peut également entraîner la libération de para-nitroaniline dans les mélanges réactionnels du Fungitell®, mais ceux-ci sont inactivés dans le cadre du processus de prétraitement.

14. Méta-Analyses

En outre, de nombreuses études évaluées par des pairs ont été publiées au sujet de l'apport du (1→3)- β -D-glucane sérique au diagnostic des infections fongiques invasives, y compris les méta-analyses de la performance diagnostique^{32,33,34,35,36,37}.

15. Légende des symboles

	Date limite d'utilisation		Consulter la notice d'utilisation
	Contenu suffisant pour « N » tests		Mandataire européen
	Code de lot		Marquage CE
	Dispositif médical pour diagnostic in vitro		Uniquement sur ordonnance

REF	N° de catalogue		Mise en garde
	Limite de température		Tenir à l'abri de la lumière du soleil
	Fabricant		Importateur
CH REP	Mandataire suisse		

16. Mandataires/Importateurs

EC REP Emergo Europe, Westervoortsedijk 60, 6827 AT Arnhem, Pays-Bas

	Mandataire suisse MedEnvoy Switzerland Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Suisse
	Importateur MedEnvoy Global B.V. Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123, 2595 AM The Hague, Pays-Bas

Sponsor australien :

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

Remarque : Tout incident grave survenu en rapport avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient sont établis.

17. Coordonnées

Siège social - **Associates of Cape Cod, Inc.**

Tél. : (888) 395-2221 ou (508) 540-3444 • Fax : (508) 540-8680
E-mail : custservice@accusa.com • www.accusa.com

Royaume-Uni/Europe - Associates of Cape Cod Int'l, Inc.

Unit 1 F/G/H Academy Business Park, Lees Road
Knowsley, Liverpool L33 7SA, Royaume-Uni
Tél. : (44) 151-547-7444 • Fax : (44) 151-547-7400
E-mail : info@acciuk.co.uk • www.acciuk.co.uk

18. Historique des révisions

Rév. 0 à 11 : Changement de test en triple exemplaire à test en double exemplaire. Remplacement de l'eau de grade réactif par l'eau de réactif LAL. Combinaison des composants KCL et KOH dans la solution alcaline de prétraitement. Retrait de la microplaqué du kit qui devient un article requis mais non fourni. Changement du mandataire européen et ajout d'un sponsor australien. Clarifications mineures, mise en forme, ajout de symboles, ajout de substances interférentes.

Rév. 12 : Suppression du mandataire européen Emergo Europe.

Rév. 13 : Mise à jour de l'adresse au Royaume-Uni et suppression de l'Allemagne. Ajout de MedEnvoy en tant qu'importateur dans l'UE et suppression de ACC Europe GmbH de la section 17. Correction d'erreurs grammaticales mineures. Mise à jour des symboles utilisés. Ajout du nom et de l'adresse du CE-REP, de l'importateur suisse et du CH-REP.

19. Références

- Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-D-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. *Medical Mycology* 44: 267-272.
- De Wach, T., 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 Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Inf. Dis.* 48: 1813-1821.
- Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Massaki, S., Tanaka, K.-I., Ishikawa, N., and Hara, K. 1995. Plasma (1→3)- β -D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidiasis, aspergillosis, and cryptococcosis. *J. Clinical Microbiol.* 33: 3115-3118.
- Binder, U., Maurer, E., and Lass-Florl, C. 2014. *Mucormycosis – from the pathogens to the disease*. *Lin. Microbiol. Infect.* 20 (Suppl 1): 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.
- 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*

15. Ivanaga, 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 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 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., Furukoshi, 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., Hirakai, 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., 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 #M1-168.*
23. Held J, Wagner D 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., Weinbergrova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, 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 hematological 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., Magiglia, R., Fadda, G., Sanginetti, 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., Kongolo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)- β -D-glucan levels in candidemia infections in the critically ill neonate. *J. of 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., Ghobrial, I.M., Finkelman, M.A., and Marty, F.M., 2012 Serum galactosomannan 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., Kerr, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Sacks, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schift, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., and J.H. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)- β -D-Glucan assay as aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin. Infect. Dis.* 41: 299-305.
32. Kourtellos, S., Tsakris, D.E., Voulgarakis, E.K., Ntziachristou, F., Michaelopoulos, 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;52:730-736.
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 -D-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 Infection in Leukemia (ECLI-3). *Clin Infect Dis.* 2012; 54:633-63.
35. Onishi, A., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., Morinobu, A., Nishimura, K., Kumaga, 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., Korhila, 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, S.I., Hang, J.P., Zhang, L.Z., Wang, F.Z., Zhang, D.C., Gong, F.H.A. 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. Fungi (Basel)* 2020 Dec 29;7(1):4.

Il est possible d'obtenir d'autres références sur notre site Web Fungitell.com

Un guide rapide de procédure de test peut être téléchargé à l'adresse Fungitell.com
site Web à l'adresse :
https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf