



#### 4. Materiais fornecidos com o kit Fungitell®

O kit Fungitell® destina-se a ser utilizado em ensaio in vitro. Os seguintes materiais fornecidos com cada kit são suficientes para ensaios em 110 poços em duas placas de microtítulação (55 poços cada):

- Reagente Fungitell®, um LAL específico do (1→3)-β-D-glucano liofilizado (dois frascos).
- O reagente Fungitell® é composto por lisado de amebócitos de *Limulus* (ou seja, limulo) e substrato colorimétrico Boc-Leu-Gly-Arg-pNA. Não contém proteínas de seres humanos ou de mamíferos.
- Tampão de reconstituição Pyrosol® (dois frascos). Frascos adicionais de tampão de reconstituição Pyrosol (número de catálogo BC051) podem ser adquiridos em separado. É composto por tampão Tris 0,2 M.
- Padrão de glucano, (1→3)-β-D-glucano liofilizado de paquimanó (dois frascos). O volume de água de grau reagente a ser adicionado está indicado no rótulo do frasco. Está calibrado contra um padrão de referência interno.
- A água de grau reagente (LRW) para LAL (dois frascos)
- Nota:** 20 ml de água de grau reagente (RGW) e LRW em frascos de vidro são equivalentes.
- Solução de pré-tratamento alcalina (dois frascos) que contém 0,125 M KOH e 0,6 M KCl

Todos os anteriores, com exceção do padrão, não contêm níveis interferentes de (1→3)-β-D-glucano.

#### 5. Materiais necessários mas não fornecidos

Nenhum material pode conter glucano interferente.

- Pontas de pipetas\* (250 µl - n° cat. PPT25, 1000 µl - n° cat. PPT10)
- Pipetas com capacidade para dispensar volumes de 5 µl-25 µl e 100 µl-1000 µl
- Pipeta repetidora com pontas de seringa com capacidade para dispensar 100 µl
- Tubos de ensaio\* para a preparação da série de padrões (curva de calibração) e combinação de reagentes de tratamento de soro (12 mm x 75 mm - n° cat. TB240 ou 13 mm x 100 mm - n° cat. TB013).
- Leitor de placa de incubação (37 °C) com capacidade de leitura a 405 nm (de preferência capaz de monitorizar dois comprimentos de onda, a 405 nm e a 490 nm) com um intervalo dinâmico de, pelo menos, 2,0 unidades de absorvância, juntamente com software de ensaio cintímetro informatizado adequado.
- Tubos esterilizados, sem glucano, para a aliquotagem de amostras. Podem ser utilizados tubos certificados como sendo isentos de RNAase, DNase e pirogénios.
- Parafilm®
- Microplicatas com 96 poços\* **Nota:** O ensaio Fungitell® foi validado com placas que têm as seguintes características: poliestireno, estéreis, não revestidas, fundo plano, sem beta-glucano interferente de acordo com as especificações da ACC e embrulhadas individualmente.

\* Estes produtos, fornecidos pela Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), estão certificados como isentos de níveis de glucanos interferentes.

#### 6. Conservação dos reagentes

- Conserve todos os reagentes, tal como fornecidos, a uma temperatura de 2 °C-8 °C abrigo da luz.
- O reagente Fungitell® reconstituído deve ser conservado a uma temperatura de 2 °C-8 °C e utilizado dentro de 2 horas. Em alternativa, o reagente Fungitell® reconstituído pode ser congelado a -20 °C durante até 20 dias, descongelado uma vez e utilizado.

#### 7. Advertências e precauções

- Não pipetar nenhum material com a boca. Não fumar, comer nem beber nas áreas de manuseamento de amostras ou reagentes do kit.
- Cumprir os regulamentos de segurança operacionais e locais.
- Usar luvas de proteção ao manusear amostras biológicas que possam ser infeciosas ou perigosas. As mãos enluvadas devem ser consideradas contaminadas em todos os momentos; manter as mãos enluvadas longe dos olhos, da boca e do nariz. Usar óculos de proteção e uma máscara cirúrgica se houver uma possibilidade de contaminação por aerossóis.
- Nota:** não utilize kits com conteúdo danificado.
- Eliminação: Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados perigosos. A eliminação deste tipo de resíduo é regulada por leis e regulamentos nacionais e regionais. Entrar em contacto com as autoridades ou empresas de gestão de resíduos locais para obter conselhos sobre a eliminação de resíduos perigosos.

• As fichas de dados de segurança para todos os componentes do kit Fungitell® podem ser transferidas a partir do website da ACC: [www.acciusa.com](http://www.acciusa.com).

#### 7.1 Precauções procedimentais

O ensaio Fungitell® exige uma atenção rigorosa à técnica e ao ambiente de teste. A formação profissional completa do técnico sobre o método de ensaio e as formas de evitar a contaminação é fundamental para a eficácia do ensaio.

- Respeitar as boas práticas laboratoriais de acordo com os regulamentos locais. Este ensaio é sensível à contaminação e à inexatidão da pipetagem.
- Prepare um ambiente limpo onde realizar o ensaio.
- Tenha em atenção que o glucano, assim como a contaminação por partículas fúngicas provenientes do corpo humano, vestuário, recipientes, água e poeiras aéreas, podem interferir com o ensaio Fungitell®.
- Possíveis fontes de contaminação: materiais com celulose, como gazes, toalhetes de papel e papéis, pipetas de vidro com tampões de algodão e pontas de pipetas com filtros de celulose. As ligaduras de gaze e compressas cirúrgicas também podem libertar grandes quantidades de (1→3)-β-D-glucano<sup>21,22</sup>. Em relação a outras fontes de contaminação relacionadas com o paciente, consultar a secção "Limitações" do teste.
- Não utilizar reagentes após o fim do prazo de validade.

#### 7.2 Maneuseamento de amostras

- A colheita de sangue e a preparação de soro devem ser realizadas de acordo com os regulamentos locais aplicáveis. Colheita de amostras: As amostras de sangue podem ser colhidas em tubos de preparação de soro ou tubos com separador de soro (SST) esterilizados, para a preparação do soro.
- Conservação de amostras: As amostras de soro podem ser conservadas a uma temperatura de 2 a 8 °C por um período de até 15 dias, ou congeladas a -20 °C por até 27 dias ou a -80 °C por até 4 anos.
- Rotulagem de amostras: As amostras devem ser identificadas de forma clara de acordo com práticas aprovadas pela instituição.

#### 8. Procedimento

##### 8.1 Configuração do instrumento e programação de testes

As definições podem variar com diferentes instrumentos e software. Em geral, aplicam-se as seguintes: Programe o software do leitor de placas para a recolha de dados no modo Vmean. Consulte as definições adequadas no manual do software para assegurar que o valor calculado é a taxa média da alteração da densidade ótica de todos os pontos de dados reunidos. Coloque o intervalo de leitura do detector no mínimo permitido pelo software/instrumento durante o período de 40 minutos do teste. As definições do comprimento de onda do software devem ser de 405 nm menos o fundo a 490 nm. Recomenda-se a utilização dos dois comprimentos de onda caso a leitura bicromática não esteja disponível. Leia o teste a 405 nm e examine a curva cinética de cada amostra de paciente quanto a sinais de interferência (ver Secção 9.0 para obter mais pormenores). A temperatura de incubação deve ser definida em 37 °C. A mistura/agitação da placa deve ser definida para 5 a 10 segundos antes do início da leitura. Selecione a definição de ajuste da curva para "linear/linear" ou equivalente. A leitura deve começar sem qualquer atraso.

##### 8.2 Preparação do padrão de glucano fornecido no kit

- Dissolva um frasco do padrão de glucano com o volume de LRW indicado no frasco, para obter uma solução de 100 pg/ml. Misture no agitador de vórtex pelo menos 30 segundos em velocidade média a média-alta para reconstituir o padrão (solução 1). A solução de glucano deve ser conservada a 2 °C-8 °C e utilizada dentro de três dias. Os passos "b" e "c" abaixo ilustram um exemplo de uma esquema de preparação de uma curva padrão.
- Prepare um padrão de 50 pg/ml (solução 2), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 1 num tubo isento de glucano (solução 2). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.
- Prepare um padrão de 25 pg/ml (solução 3), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 2 num tubo isento de glucano (solução 3). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.
- Prepare um padrão de 12,5 pg/ml (solução 4), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 3 num tubo isento de glucano (solução 4). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.
- Prepare um padrão de 6,25 pg/ml (solução 5), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 4 num tubo isento de glucano (solução 5). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.

##### 8.3 Abra a solução de pré-tratamento alcalina

A solução de pré-tratamento alcalina converte glucanos de tripla hélice em glucanos de cadeia simples<sup>17,18</sup>, os quais são mais reativos no ensaio. Além disso, o pH alcalino serve para inativar as proteases e inibidores séricos que podem interferir com o ensaio.<sup>24</sup>

Elimine o frasco (de acordo com os procedimentos laboratoriais) exceto se for utilizá-lo num teste a seguir, caso em que deverá tapá-lo com Parafilm, utilizando o lado do Parafilm que estava virado para o revestimento de papel.

#### 8.4 Configuração da placa de microtitulação

Configure a disposição da placa de microtitulação no software com os padrões (Std), os controlos negativos (Neg) e 21 amostras (Spl). Recomenda-se a seguinte disposição:

	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												

Introduza as concentrações padrão nas definições do software como 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml e 31 pg/ml, respectivamente.

Tenha em atenção que as concentrações de padrão introduzidas são cinco vezes superiores às preparadas na Secção 8.2 acima. Isto deve-se ao facto de o volume de padrão utilizado no ensaio ser de 25 µl por poço, ou seja, cinco vezes o volume da amostra de soro utilizada (ver Secção 8.5 b a seguir). Desta forma, a amostra de soro é, na verdade, diluída cinco vezes em relação ao padrão. A multiplicação das concentrações de padrão por cinco compensa esta diluição.

**Observação:** os poços externos podem ser utilizados caso se tenha demonstrado que o desempenho destes poços é semelhante aos poços internos.

**Observação:** o controlo negativo não se destina a ser utilizado na curva padrão.

#### 8.5 Adição do soro e da solução de pré-tratamento alcalina

- Descongele as amostras de soro congeladas à temperatura ambiente. Misture bem todas as amostras no agitador de vórtex durante pelo menos 30 segundos em velocidade média a média-alta.
- Transfira 5 µl da amostra de soro para cada um dos micropoços designados (Uk) pelo menos em duplicado. Repita para cada amostra de soro.
- Adicione 20 µl de solução de pré-tratamento alcalina a cada poço que contenha soro. Certifique-se de que as gotículas de soro e de solução de pré-tratamento entram em contacto.
- Observação: os passos "b" e "c" podem ser realizados por ordem inversa segundo a preferência do técnico.
- Observação: para evitar a contaminação accidental, volte a colocar a tampa na micropatra depois de adicionar as amostras e os reagentes aos poços.
- Agite a placa durante 5 a 10 segundos para misturar o conteúdo do micropoço (poderá utilizar a função de agitação de placa do leitor) e, em seguida, incube durante 10 minutos a 37 °C no leitor da placa de incubação.

#### 8.6 Reconstituição do reagente Fungitell®

**Observação:** isto poderá ser feito de forma cónica enquanto a incubação de pré-tratamento decorre. A consistência do momento da reconstituição melhorará a reprodutibilidade, uma vez que a reação do ensaio Fungitell® começa após a reconstituição, embora a um nível baixo.

Reconstitua um frasco de reagente Fungitell®, adicionando 2,8 ml de LRW e, em seguida, 2,8 ml de tampão de reconstituição Pyrosol com a pipeta de 1000 µl. Tape o frasco com Parafilm utilizando o lado do Parafilm que estava virado para o revestimento de papel. Rode o frasco suavemente para dissolver na totalidade — não misture no agitador de vórtex.

#### 8.7 Adição de controlos negativos e padrões de glucano

No fim da incubação de pré-tratamento do soro (Secção 8.5 d), retire a placa do leitor da placa de incubação e adicione os padrões e os controlos negativos à placa. Modelo de concentração de padrões recomendado:

- Adicione 25 µl de LRW aos poços G2 e G3.
- Adicione 25 µl da solução de padrão 5 de 6,25 pg/ml aos poços F2 e F3, marcados como 31,25 pg/ml.
- Adicione 25 µl da solução de padrão 4 de 12,5 pg/ml aos poços E2 e E3, marcados como 62,5 pg/ml.
- Adicione 25 µl da solução de padrão 3 de 25 pg/ml aos poços D2 e D3, marcados como 125 pg/ml.
- Adicione 25 µl da solução de padrão 2 de 50 pg/ml aos poços C2 e C3, marcados como 250 pg/ml.
- Adicione 25 µl da solução de padrão 1 de 100 pg/ml aos poços B2 e B3, marcados como 500 pg/ml.

#### 8.8 Procedimento de adição do reagente Fungitell® e incubação da placa

- Adicione 100 µl de reagente Fungitell® a cada poço (contendo os controlos negativos, os padrões e as amostras) com a pipeta repetidora.
- Insira a placa no leitor de microplicatas (equilibrado a 37 °C), retire a tampa e agite durante 5–10 segundos. Se o leitor de placa não tiver uma função de

agitação da microplaca disponível, poderá utilizar-se um agitador de microplaca externo.

Leia a placa **sem a tampa** a 405 nm menos 490 nm durante 40 minutos a 37 °C. Nota: se, por questões de tempo, o instrumento não permitir a remoção da tampa entre a agitação e a leitura, agite com a tampa retirada para assegurar a leitura sem a tampa colocada.

## 9. Cálculo dos resultados

Recolha os dados e analise-os da seguinte forma: Examine os gráficos cinéticos das amostras de teste e verifique quanto a padrões diferentes de um aumento suave comparável aos padrões. Inválida os gráficos que indiquem interferência ótica (p. ex., os perfis cinéticos não seguem os dos padrões). Calcule a taxa média de alteração da densidade ótica (unidades de miliabsorvância por minuto) para todos os pontos entre 0 e 40 minutos (efetuado pelo software). Proceda à interpolação das concentrações de (1→3)-β-D-glucano da amostra a partir da curva padrão (efetuado pelo software).

## 10. Controlo da qualidade

- O coeficiente de correlação (*r*) da curva padrão (linear vs. linear) deve ser ≥ 0,980.
- Os pocos com 25 µl de LWR são os controlos negativos. Os controlos negativos devem ter valores de taxa (p. ex., unidades de miliabsorvância por minuto) inferiores a 50% das taxas do padrão mais baixo. Se não for o caso, o ensaio deve ser repetido utilizando novos reagentes (todos).
- Tratamento de amostras complexas. Se o analista observar uma cinética invulgar num teste de uma amostra, p. ex., uma amostra turva, descorada ou com partículas (como amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com bilirrubina excessiva), a amostra tem de ser diluída com LWR e ser novamente testada. Na apresentação dos resultados, é necessário ter a diluição em consideração, multiplicando o resultado pelo fator de diluição. **Tipicamente, o fator de diluição é introduzido na configuração do software para a amostra e a correção é automaticamente aplicada.**

### Observação:

- Cada utilizador do teste deve estabelecer um programa de controlo da qualidade para assegurar a proficiência no desempenho do teste, de acordo com os regulamentos aplicáveis à sua localização.
- Recomenda-se testar amostras de controlo sérico (negativo, próximo do valor-limite ou fortemente positivo) no contexto de verificações laboratoriais adicionais e das boas práticas laboratoriais. Estes não estão incluídos no kit Fungitell®.

## 11. Interpretação dos resultados

### RESULTADO NEGATIVO

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

O laboratório a realizar o teste deve informar o médico que solicitou o teste de que nem todas as infecções fúngicas produzem níveis elevados de (1→3)-β-D-glucano no soro. Alguns fungos, como os do género *Cryptococcus*<sup>3,4</sup>, produzem níveis muito baixos de (1→3)-β-D-glucano. Não se conhece qualquer atividade de produção de (1→3)-β-D-glucano por *Mucorales*, como *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus*<sup>1,4</sup>. De igual modo, o *Blastomycetes dermatitidis*, na sua fase de levedura, produz pouco (1→3)-β-D-glucano, tendo os pacientes com blastomicose normalmente níveis indetectáveis de (1→3)-β-D-glucano no ensaio Fungitell®<sup>5</sup>.

### RESULTADO INDETERMINADO

Valores entre 60 pg/ml e 79 pg/ml são considerados inconclusivos. Recomenda-se uma nova colheita e teste de soro. A colheita e o teste de amostras frequentes melhoram a utilidade do diagnóstico.

### RESULTADO POSITIVO

Valores de (1→3)-β-D-glucano ≥ 80 pg/ml são interpretados como sendo um resultado positivo. Um resultado positivo não define a presença de doenças e deve ser utilizado em conjunto com outros resultados clínicos para se estabelecer um diagnóstico.

## 12. Limitações do teste

- As localizações da infecção fúngica nos tecidos<sup>10</sup>, a encapsulação e a quantidade de (1→3)-β-D-glucano produzida por determinados fungos podem afetar a concentração deste analito no soro. A capacidade reduzida de contribuição de (1→3)-β-D-glucano para a corrente sanguínea pode reduzir a capacidade de deteção de determinadas infecções fúngicas.
- Alguns indivíduos têm níveis elevados de (1→3)-β-D-glucano que se situam na zona indeterminada. Nestes casos, recomenda-se um teste de vigilância adicional.
- A frequência de realização de testes ao paciente dependerá do risco relativo de infecção fúngica. Recomendam-se testes de colheita de amostras de pelo menos duas a três vezes por semana nos pacientes em risco.
- Observaram-se resultados positivos em pacientes hemodialisados<sup>19,20,38</sup>, participantes tratados com determinados derivados de sangue fracionado, como albumina e imunoglobulinas séricas<sup>23,25</sup> e em amostras ou participantes expostos a gazes e compressas cirúrgicas que continham glucano. Após a exposição cirúrgica a compressas e gazes com (1→3)-β-D-glucano, os pacientes necessitam de três a quatro dias para a reposição dos níveis iniciais de (1→3)-β-D-glucano no soro<sup>21,22</sup>. Da mesma forma, o momento da colheita de amostras a pacientes cirúrgicos deve ter este fator em consideração.

- As amostras obtidas por métodos de picada no calcanhar ou dedo são inaceitáveis, uma vez que foi demonstrado que a compressa com álcool utilizada para preparar o local (e, potencialmente, a acumulação de sangue na superfície da pele) contamina as amostras. Nos estudos realizados até à data, não se observaram diferenças entre as amostras obtidas por colheitas em linha ou por venopunção<sup>23,27</sup>.
- Para obter uma revisão abrangente dos fatores que contribuem para resultados falsos positivos para o (1→3)-β-D-glucano, queira consultar Finkelman, M.A., *Journal of Fungi* (2021)<sup>39</sup>.
- Os níveis de teste foram estabelecidos em participantes adultos. Estão a ser investigados níveis normais e de "cut-off" para bebés e pacientes pediátricos<sup>28,29</sup>.

## 13. Características do desempenho

### 13.1 Cut-off e valores esperados

Um estudo multicéntrico, prospectivo<sup>31</sup> realizado para determinar a sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do ensaio Fungitell® (ver testes de comparação a seguir) demonstrou que os valores de beta glucano estão elevados para diversas infecções fúngicas. Quando surgem sinais e sintomas a um nível de 80 pg/ml ou superior, o valor preditivo de que o participante é positivo para uma infecção fúngica varia entre 74,4 e 91,7%. Na ausência de sinais e sintomas em níveis inferiores a 60 pg/ml, os valores preditivos negativos variaram de 65,1% a 85,1%.

### 13.2 Desempenho clínico

Foi realizado um estudo multicéntrico, prospectivo para validar as características de desempenho do ensaio Fungitell®<sup>21</sup>. O teste foi comparado com outros métodos de deteção padrão (ou seja, hemocultura, exame histopatológico de amostra de biopsia e sinais radiológicos) de micoses e fungemias.

No ensaio, foram testados trezentos e cinquenta e nove (359) participantes. Foi obtida uma amostra única de cada participante. Os participantes de baixo risco incluíram indivíduos aparentemente saudáveis e indivíduos nos centros clínicos cujo internamento hospitalar se deve a outras razões além das infecções fúngicas. A adição de participantes foi realizada em seis centros clínicos nos Estados Unidos da América. Quatro dos centros clínicos efetuaram o ensaio e testaram um total de 285 amostras. A ACC testou todas as 359 amostras duas vezes, embora apenas o segundo conjunto de resultados tenha sido utilizado para determinar o desempenho do ensaio. Os resultados do segundo conjunto de análises não foram estatisticamente diferentes do primeiro conjunto.

### • Sensibilidade de diagnóstico

A sensibilidade para toda a população de participantes (359), incluindo pacientes com criptococose, foi de 65,0% ([intervalo de confiança (IC) de 95%: 60,1%-70,0%]) (Tabela 1).

### • Especificidade de diagnóstico

A especificidade foi de 81,1% (IC de 77,1%-85,2%). Quando os 170 participantes negativos para infecção fúngica e indivíduos aparentemente saudáveis foram analisados, a especificidade foi de 86,5% com o ensaio (IC de 82,8%-90,1%). Quando foram incluídos os 26 participantes adicionais que foram negativos para infecção fúngica, mas tinham outras doenças, observou-se uma especificidade de 81,1% (IC de 77,1%-85,2%).

Tabela 1 Resultados do teste ACC no nível de "cut-off" de 60 pg/ml-80 pg/ml por centro

Centro	Sensibilidade comprovada/Sensibilidade >=80pg/ml		Especificidade < 60 pg/ml		Ambiguo 60 < X < 80	Total		
	Pos/ Clin. pos.	Sensibili- dade - tude	Neg/ Clin. neg.	Especifi- cida- de				
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	N/A	0/0	N/A	0,0	0	1
Total	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Quando os resultados obtidos por ACC (359 amostras) e pelos centros clínicos (285 amostras) foram comparados com o diagnóstico clínico, a sensibilidade foi de 64,3% (IC de 58,8%-69,9%) para o ACC e de 61,5% (IC de 55,9%-67,2%) para os centros. A especificidade foi de 86,6% (IC de 82,7%-90,6%) para o ACC versus 79,6% (IC de 74,9%-84,3%) para os centros.

### Candidíase

No estudo prospectivo, houve 107 participantes com diagnóstico positivo de candidíase. Dos 107, 83 eram positivos com o ensaio Fungitell®.

A Associates of Cape Cod, Inc. forneceu cento e setenta e cinco amostras de biblioteca de candidíase, tendo 145 das 175 sido positivas no ensaio.

## Aspergilose

Um total de 10 participantes eram positivos para aspergilose. Dos 10, 8 eram positivos com o ensaio.

### Fusariose

Três participantes eram positivos para fusariose. Dos 3, 2 eram positivos com o ensaio.

### Terapêutica medicamentosa antifúngica

A presença ou ausência de terapêutica medicamentosa antifúngica não teve qualquer efeito estatisticamente significativo na sensibilidade do ensaio. Constatou-se que 118 participantes eram positivos para infecção fúngica invasiva e estavam a fazer terapêutica antifúngica. Destes, 82 eram positivos com o ensaio (sensibilidade, 69,5%; IC de 61,2%-77,8%). Além disso, constatou-se que vinte e quatro (24) participantes eram positivos, mas não estavam a fazer terapêutica antifúngica. Destes, 18 eram positivos com o ensaio (sensibilidade, 75%; IC de 57,7%-92,3%).

### 13.3 Correlações do teste

Quatro dos centros clínicos analisaram um total de 285 amostras. Os resultados dos testes nos centros tiveram uma correlação quantitativa de 96,4% com os resultados da Associates of Cape Cod, Inc. As correlações da Associates of Cape Cod, Inc. com os diferentes centros de teste variaram de 90,6% a 99,2%.

### 13.4 Precisão

O ensaio Fungitell® foi avaliado quanto à precisão (ou seja, repetibilidade e reprodutibilidade) utilizando (10) amostras diferentes que foram testadas, cada uma, por três centros de teste, em três dias diferentes. A variação intra-ensaio variou entre 0,9% e 28,9%, e serviu como uma medida da repetibilidade. Os valores inter-ensaio variaram entre 3,9% e 23,8%, e serviram como uma medida da reprodutibilidade. As quatro (4) amostras negativas foram excluídas de ambas as análises.

### 13.5 Intervalo de medição e linearidade

Os resultados são expressos em pg/ml de soro e variam desde não detetáveis (< 31 pg/ml) a > 500 pg/ml, e são impressos pelo software ou lidos a partir da curva padrão. Para valores acima de 500 pg/ml, e são necessários diluir a amostra com água de grau reagente para LAL e voltar a testá-la. Conforme indicado na secção Controlo de Qualidade, o coeficiente de correlação (*r*) da curva padrão (linear vs. linear) que abrange o intervalo de medição do ensaio Fungitell® deve ser ≥ 0,980 e os controlos negativos devem ter valores de taxa (p. ex., unidades de miliabsorvância por minuto) inferiores a 50% das taxas do padrão mais baixo. Se não for o caso, o ensaio deve ser repetido utilizando novos reagentes (todos).

### 13.6 Substâncias interferentes

As condições seguintes podem interferir com a exatidão de um resultado do ensaio Fungitell®:

- As amostras descoradas ou turvas, como as amostras demasiado hemolisadas, lipémicas ou com bilirrubina excessiva, podem provocar uma interferência ótica com o ensaio. Se tais amostras forem testadas, os resultados dos testes deverão ser examinados pela existência de evidências de interferência ótica e/ou padrões cinéticos invulgares.
- Níveis elevados de imunoglobulina G, talis como os que podem existir no soro devido a múltiplos mielomas, podem resultar em precipitação na mistura de reação após a adição de Fungitell® ao soro pré-tratado<sup>30</sup>.
- Quando estas informações foram redigidas, não existia deserto qualquer fator G de ativação (elemento de deteção do (1→3)-β-glucano) do reagente Fungitell® para além do (1→3)-β-glucano. Em alguns estudos, em que foram feitas asserções de reatividade cruzada, o tratamento do suposto material de ativação com (1→3)-β-glucanase purificada eliminou o sinal, demonstrando que a ativação observada tinha ocorrido por causa de (1→3)-β-glucano contaminante<sup>15</sup>. A contaminação por proteína de serina também pode resultar na libertação de paracetamolina nas misturas reativas do Fungitell®, mas estas são desativadas como parte do processo de pré-tratamento.

### 14. Meta-analises

Além disso, foram publicados inúmeros estudos revistos por pares sobre o tema do supórtio baseado em evidências do (1→3)-β-D-glucano em soro no diagnóstico de doenças fúngicas invasivas, incluindo meta-analises do desempenho do

## 15. Legenda dos símbolos

	Prazo de validade		Consultar as instruções de utilização
	Conteúdo suficiente para "N" testes		Mandatários na UE
	Código do lote		Marca CE
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Apenas para utilização mediante prescrição médica

<b>REF</b>	N.º de catálogo		Atenção
	Limites de temperatura		Mantener ao abrigo da luz solar
	Fabricante		Importador
<b>CH REP</b>	Mandatários da Suíça		

## 16. Mandatários/Importador

<b>EC REP</b>	Emergo Europe, Westervoortsedijk 60, 6827 AT Arnhem, Países Baixos
<b>CH REP</b>	<b>Mandatários da Suíça</b> MedEnvoy Switzerland Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Suíça
<b>Importador</b>	<b>MedEnvoy Global B.V.</b> Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123 2595 AM The Hague, Países Baixos

Promotor australiano:  
Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park  
201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Austrália

**Observação:** Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro em que o utilizador e/ou paciente estão estabelecidos.

## 17. Informações de contacto

**Endereço - Associates of Cape Cod, Inc.**  
Tel: (888) 395-2221 ou (508) 540-3444 • Fax: (508) 540-8680  
E-mail: custservice@acciusa.com • www.acciusa.com

## Reino Unido/Europa - Associates of Cape Cod Int'l, Inc.

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

## 18. Historial de revisões

Rev 0 a 11: Alteração de testes em triplicado para duplicado. Substituição de água de grau reagente por água de grau reagente para LAL. Combinção dos componentes KCl e KOH na solução de pré-tratamento alcalina. Retirada da microplaca do kit, passando a item necessário, mas não fornecido. Alteração do mandatário na CE e adição do promotor australiano. Pequenas clarificações, formatação, adição de símbolos, substâncias adicionais.

Rev. 12: Removido REP CE Emergo Europe.

Rev. 13: Atualização do endereço no Reino Unido e remoção da Alemanha. Adição de MedEnvoy como importador na UE e remoção de ACC Europe GmbH da secção 17. Correção de pequenos erros gramaticais. Atualização dos símbolos utilizados. Adição de EC-REP, Importador Suíço e de nome e endereço CH-REP.

## 19. Bibliografia

- 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 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. *Clinical Microbiology* 33: 3115-3118.
- Binder, U., Maurer, E., and Lass-Florl, C. 2014. *Mucormycosis – from the pathogens to the disease*. *Linf. 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.
- Walsh, T.J., Groll, A.H. 2013. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl. Infectious Dis.* 1999: 1247-261.
- Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. *New England Journal of Medicine*. 1998; 338:1741-1751.
- 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: 17-20.
- Fridkin, S.K., and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Micro. Rev.* 9: 499-511.
- Alexander, B. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl. Infectious Dis.* 2002;

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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -D-Glucan derived from different gauze types. *Tohoku J. Exp. Med.* 217: 117-121.
22. Mohr, J., Paetzick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of  $\beta$ -glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU). *ICAAC Poster #M1-168.*
23. Held J, Wagner D $\beta$ -d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:118-22.
24. Tamura, H., Arimoto, T., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T., and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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- $\beta$ -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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -D-glucan levels in candidemia 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., Ghobrial, I.M., Finkelman, M.A., and Marty, F.M., 2012 Serum galactomannan and (1→3)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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., Ntiamo, F., Michaelopoulos, A., Rafailidis, P.I., Falagas, M.E.  $\beta$ -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2011;52:750-760.
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.  $\beta$ -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.I., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., Morinobu, A., Nishimura, K., Kumaga, S. Diagnostic accuracy of serum 1,3- $\beta$ -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:7-14.
36. Karageorgopoulos, D.E., Qu, J.M., Korhila, I.P., Zhu, Y.G., Vasiliou, V.A., Falagas, M.E. Accuracy of  $\beta$ -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- $\beta$ -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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -D-Glucan-Supported Diagnosis of Invasive Fungal Disease. *J. Fungi (Basel)* 2020 Dec 29;7(1):4.

Poderá encontrar mais referências bibliográficas no nosso website em [Fungitell.com](http://fungitell.com)

É possível transferir uma descrição rápida do procedimento de teste a partir do website da [Fungitell.com](https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf)  
[https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell\\_ProcedureOutline\\_PR18-016.pdf](https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf)