


<p><b>Test do badania zawartości (1→3)-β-D-glukanu w surowicy</b></p>	
<p><b>FUNGITELL® STAT</b></p>	
<p><b>Instrukcja stosowania</b></p>	
<p> ASOCIATES OF <b>CAPE COD</b> INCORPORATED</p> <p>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</p>	<p>Nr telefonu: (508) 540-3444 Bezpłatna linia: (888) 395-2221 Faks: (508) 540-8680 Dział pomocy technicznej: (800) 848-3248 Dział obsługi klienta: (800) 525-8378</p>
<p>PN002603-pl Rev002</p>	<p>11-03-2020</p>

 Instrukcję stosowania w wybranym języku można znaleźć na stronie [www.acciusa.com](http://www.acciusa.com).

**PRZEZNACZENIE**

Test Fungitell® STAT jest testem kolometrycznym, w którym zastosowano zymogen proteazy. Służy do jakościowego oznaczania (1→3)-β-D-glukanu w surowicy pacjentów z chorobami predysponującymi do inwazyjnego zakażenia grzybiczego lub z objawami takiego zakażenia. Informacja o stężeniu (1→3)-β-D-glukanu w surowicy, ważnego składnika ściany komórkowej istotnych w medycynie grzybów<sup>1</sup>, może być przydatna w diagnostyce głębokich mikoz i fungemii<sup>2</sup>. Wynik dodatni nie wskazuje na gatunek grzyba powodującego zakażenie.

Danych o mianie (1→3)-β-D-glukanu należy używać w powiązaniu z wynikami innych procedur diagnostycznych, takich jak posiew, badanie histologiczne próbek biopsyjnych oraz badanie radiologiczne.

**PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIA**

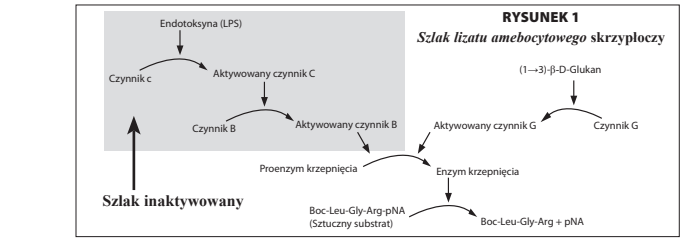
Częstość zakażeń grzybiczych powodowanych przez patogeny oportunistyczne wzrasta, zwłaszcza wśród pacjentów z zaburzeniami układu odpornościowego<sup>3,4</sup>. Inwazyjne choroby grzybicze, będące zakażeniami oportunistycznymi, są częste wśród pacjentów z hematologicznymi nowotworami złośliwymi lub AIDS i odpowiadają za wzrastającą liczbę zakażeń szpitalnych, zwłaszcza wśród biorców przeszczepów narządów i innych pacjentów poddawanych leczeniu immunosupresyjnemu<sup>5</sup>. W wielu przypadkach do zakażeń chorobami grzybiczymi dochodzi w wyniku wychyiania zarodników pochodzących z gleby, martwych szczątek roślin, systemów wentylacyjnych oraz/lub zakażonych powierzchni. Niektóre grzyby oportunistyczne występują w/na ludzkiej skórze, w jelitach i błonach śluzowych<sup>6</sup>. Przy diagnozowaniu inwazyjnych mikoz i fungemii wykorzystuje się zwykle nieswoiste techniki diagnostyczne lub radiologiczne. Ostatnio zestaw metod diagnostycznych uzupełniono o biologiczne markery zakażenia grzybiczego<sup>7</sup>.

Do patogenów oportunistycznych należą *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum*, oraz *Pneumocystis jirovecii*. (1→3)-β-D-glukan wytwarzany przez te organizmy można wykryć stosując test Fungitell® STAT<sup>3,7,8,9,11</sup>.

**ZASADA PROCEDURY**

Test Fungitell® STAT stworzono modyfikując format testu Fungitell®. Test Fungitell® STAT opracowano odpowiadając na zapotrzebowanie na format testu jednorazowego o mniejszych rozmiarach zestawu niż płytka 96-studenckowa, stosowana w teście Fungitell®.

Test Fungitell® STAT umożliwia jakościowe oznaczanie (1→3)-β-D-glukanu. Test opiera się na modyfikacji szlaku lizatu amebocytowego skrzypłocy (LAL)<sup>12,13,14,15</sup>. **Rysunek 1.** Odczynnik Fungitell® STAT został zmodyfikowany w celu wyeliminowania reakcji na endotoksyny bakteryjne, dzięki temu reaguje on wyłącznie na (1→3)-β-D-glukan za pośrednictwem części szlaku mediowanej przez czynnik G. Czynnik G, zymogen proteazy serynowej, jest aktywowany przez (1→3)-β-D-glukan. Aktywowany czynnik G przekształca proenzym w aktywny enzym krzepnięcia, który z kolei powoduje rozszczepienie para-nitroanilidu (pNA) z peptydowego substratu chromogennego, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA i powstanie chromoforu, para-nitroaniliny, pochłaniającej fale o długości 405 nm. Opisany poniżej test kinetyczny Fungitell® STAT opiera się na określaniu tempa wzrostu gęstości optycznej próbki. Tempo to jest porównywane do tempa wzrostu gęstości optycznej wzorca Fungitell® STAT Standard i na tej podstawie uzyskuje się wskaźnik. Ten wskaźnik próbek pobranych od pacjentów jest jakościowo interpretowany jako wynik ujemny, nieokreślony lub dodatni, odpowiednio do zakresów wartości wskaźnika, podanych w **Tabeli 1** poniżej.



**TABELA 1 ZAKRESY WARTOŚCI WSKAŹNIKA FUNGITELL® STAT**

Wynik	Wartość wskaźnika
Ujemny	≤ 0,74
Nieokreślony	0,75 – 1,1
Dodatni	≥ 1,2

**MATERIAŁY DOSTARCZONE WRAZ Z PRODUKTEM FUNGITELL® STAT**

Produkt Fungitell® STAT jest przeznaczony do diagnostyki *in vitro*. Następujące materiały, dostarczane wraz z każdym produktem, wystarczają do przeprowadzenia łącznie 10 reakcji (przy użyciu 10 fiołek odczynnika Fungitell® STAT). Każdy produkt zawiera także 5 fiołek wzorca Fungitell® STAT, może zatem wystarczyć do wykonania do 5 oznaczeń, jeśli za każdym razem oznaczana jest 1 fiołka wzorca Fungitell® STA i 1 próbka pobrana od pacjenta. Jedna fiołka wzorca Fungitell® STAT może też posłużyć do zbadania do 9 próbek pobranych od pacjentów.

- Odczynnik Fungitell® STAT, liofilizowany test LAL swoisty względem (1→3)-β-D-glukanu (10 fiołek). Odczynnik *Fungitell® STAT Reagent nie zawiera (1→3)-β-D-glukanu w stężeniu mogącym zakłócać przebieg reakcji.*
- Wzorzec Fungitell® STAT (5 fiołek), z podaną na etykiecie, odpowiednią do nr serii, objętością do rozcieńczenia
- Instrukcja stosowania
- Krótka instrukcja wizualna

**MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE**

Żadne materiały nie mogą zawierać glukanu, który mógłby zaburzać przebieg reakcji. Wyroby szklane muszą zostać poddane trwającej co najmniej 7 godzin deproteinizacji w temperaturze co najmniej 235 °C (lub w zwiadlowanych warunkach równoważnych).

- Woda do odczynnika LAL\* (fiołka 5,5 ml, nr kat. W0051-10)
- Roztwór zasadowy do wstępnej obróbki 0,125 M KOH i 0,6 M KCl \* (fiołka 2,5 ml, nr kat. APS51-5 )
- Pipety odpowiednie do dozowania objętości 20-200 µl i 100-1000 µl
- Końcówki pipet\* (250 µl nr kat. PPT25 i 1000 µl nr kat. PPT10)
- Końcówki pipet długie\* (20-200 µl, nr kat. TPT50)
- Próbki testowe\* do przygotowywania próbek pobranych od pacjentów i łączenia z roztworem do wstępnej obróbki surowicy. (12 x 75 mm, katalog # TB240-5)
- Czynnik próbek\* i oprogramowanie do testów kinetycznych

a) Automatyczny, 8-studenckowy czynnik Lab Kinetics z funkcją inkubacji (instrument PKF08) oraz oprogramowanie analityczne Beta Glukan (BG Analytics™), dostarczane przez Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) nr kat. PKF08-PKG\*\* **lub**

b) czynnik próbek\* z funkcją inkubacji (37°C), nadający się do odczytu fal o długości 405 nm i 495 nm, o zakresie co najmniej 0 – 1,0 jednostek absorbancji i odpowiedni do fiołek o średnicy 12 mm; wyposażony w odpowiednie oprogramowanie komputerowe do obsługi testów kinetycznych, mogące śledzić i analizować kinetykę reakcji oraz przeprowadzać analizę kryteriów wymienionych w części Instrukcji stosowania poświęconej kontroli jakości.

8. Jאלowe, niezawierające glukanu próbki do przechowywania z zatyckami, przeznaczone do przygotowywania alikwotów próbek (większość próbek z certyfikatem braku RNAzy, DNAzy i pirogenów nie zawiera (1→3)-β-D-glukanu w stężeniu powodującym zakłócenia reakcji).

9. Parafilm®

*\*Produkty te, dostarczane przez Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), mają certyfikat, potwierdzający, że nie są zanieczyszczone glukanem, zakłócającym przebieg reakcji.*

*\*\*Kopie programów BG Analytics™ oraz Instrukcji obsługi instrumentów PKF08 można pobrać ze strony ACC website: [www.acciusa.com](http://www.acciusa.com).*

**Uwaga** - szklane pipety z bawelnianymi zatyckami oraz końcówki mikropipet z celulozowymi filtrami to potencjalne źródła zanieczyszczenia glukanem.

**OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI**

*Produkt jest przeznaczony do DIAGNOSTYKI IN VITRO.*

*W czasie stosowania produktu Fungitell® STAT wymagane jest rygorystyczne przestrzeganie wymagań dotyczących techniki i środowiska testu. O skuteczności wykonywania testu w znacznej mierze decyduje poziom przeszkolenia personelu w zakresie tej metody oznaczania i unikania zanieczyszczeń.*

1. Grzyby niektórych gatunków wytwarzają bardzo niewielkie ilości (1→3)-β-D-glukanu i w testach Fungitell® STAT zwykle nie są wykrywane. Należą do nich grzyby z rodzaju *Cryptococcus*<sup>6,17</sup> a także takie pleśniakowce, jak *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus*<sup>17</sup>. Ponadto niewielką ilość(1→3)-β-D-glukanu wytwarza grzyb *Blastomyces dermatitidis* w formie drożdży i z tego powodu zwykle także i ten gatunek nie jest wykrywany przez odczynnik Fungitell® STAT<sup>18</sup>.

2.Zadnego materiału nie należy pipetować ustami. Nie palić, nie jeść i nie pić w miejscu prac z odczynnikami lub próbkami. Przestrzegać lokalnych i obowiązujących w danej instytucji przepisów bezpieczeństwa.

3.Przygotować czyste miejsce do przeprowadzania testów. Stosować materiały i odczynniki, które mają certyfikat, potwierdzający, że nie są zanieczyszczone (1→3)-β-D-glukanem o wykrywalnym stężeniu. Należy pamiętać, że glukan oraz skażenie grzybami pochodzącymi z ludzkiego ciała, odzieży, pojemników, wody oraz pyłów unoszących się w powietrzu mogą zakłócać przebieg testu Fungitell® STAT. Materiały celulozowe, takie jak gaza, papierowe chusteczki i kartony mogą oddawać (1→3)-β-D-glukan do środowiska, w którym wykonywany jest test

4.Nie należy używać odczynników po upływie terminu ich ważności.

5.Próbki przebarwione lub mętne, na przykład w znacznej mierze zhemolizowane, lipidyczne lub o zbyt wysokim stężeniu bilirubiny, mogą powodować interferencję optyczną w teście. W przypadku testowania takich próbek należy sprawdzić wyniki pod kątem dowodów na interferencję optyczną i/lub nietypowe schematy kinetyczne.

6.Podczas pracy z próbkami pobranymi od pacjentów należy nosić odpowiednią odzież ochronną i rękawice bezpydrowe.

7.W przypadku używania niektórych celulozowych membran dializacyjnych, surowica hemodializowanych pacjentów może zawierać (1→3)-β-D-glukan o wysokim stężeniu<sup>19,20</sup>. Jak się wydaje, hemodializy przeprowadzane przy zastosowaniu membran z trioctanu celulozy, membrany polisulfonowej lub membran z polimetakrylanu metylu nie powodują zakłóceń przebiegu testu.

8.Gazy i gąbki chirurgiczne mogą uwalniać duże ilości (1→3)-β-D-glukanu i w związku z kontaminacją przejściowo powodować otrzymywanie dodatniego wyniku testu Fungitell®, taką sytuację obserwowano u pacjentów po zabiegach operacyjnych<sup>21,22</sup>.

9.Również produkty frakcjonowania krwi, takie jak dożylny preparaty immunoglobin i albumin mogą zawierać (1→3)-β-D-glukan i po iniekcji lub wlewie być przyczyną podwyższonego przez kilka dni miana (1→3)-β-D-glukanu<sup>3</sup>.

10. Nie należy używać zestawów o uszkodzonej zawartości.

11. Materiały stykające się z potencjalnie szkodzonymi (zawierającymi patogen) płynami należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami.

**PRZECHOWYWANIE ODCZYNNIKÓW**

Wszystkie odczynniki należy przechowywać w dostarczonych opakowaniach, w ciemnym miejscu, w temp. 2-8 °C. Odczynnik Fungitell® STAT Reagent i wzorzec Fungitell® STAT należy zużyć w ciągu godziny od rekonstytucji.

**POSTĘPOWANIE Z PRÓBKAMI**

1. Pobieranie próbek: próbki krwi można pobierać do jałowych próbek\* do przygotowywania surowicy lub próbek\* do oddzielania surowicy (SST).

2.Przygotowywanie próbek: próbki surowicy można przed wykonaniem testu chwilowo przechowywać w temperaturze 2-8°C, w przypadku dłuższego przechowywania należy je zamrozić w temperaturze -20°C lub niższej.

3.Oznaczenie próbek: próbki należy wyraźnie oznakować, zgodnie z praktykami obowiązującymi w danej instytucji.

**PROCEDURA**

Do opakowania zestawu Fungitell® STAT dołączono opis automatycznego instrumentu PKF08 oraz opis procedury stosowania oprogramowania BG Analytics™.

W przypadku używania instrumentu PKF08 i oprogramowania BG Analytics™ niektóre z opisanych poniżej etapów procedury przebiegają automatycznie, m.in., konfiguracja instrumentu, kontrola jakości i interpretacja wyników. Więcej informacji można znaleźć w Instrukcji obsługi oprogramowania BG Analytics™ lub uzyskać od producenta.

*Uwaga:*

- Należy stosować się do lokalnie obowiązujących zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Opiswany test jest wrażliwy na zanieczyszczenia i niedokładności pipetowania.*

- Zaleca się przeprowadzanie etapów 3-5 i 7 w komorze bezpieczeństwa biologicznego, pozwoli to zwiększyć bezpieczeństwo operatora pracującego z próbkami pobranymi od pacjentów i zmniejszyć prawdopodobieństwo skażenia próbek (1→3)-β-glukanem obecnym w środowisku.*

- Aby ograniczyć niepotrzebne przenoszenie fiołek szklanych do i z komory bezpieczeństwa biologicznego, zaleca się umieszczenie w niej urządzenia mieszającego (o ile utrzymywany jest odpowiedni przepływ powietrza).*

- Zaleca się stosowanie długich końcówek pipet w celu zmniejszenia możliwości skażenia krzyżowego zawartości fiołek.*

- Wzorzec Fungitell® STAT (czerwony korek i etykieta z czerwoną kreską) należy zawsze przewozić w tych samym warunkach i w tym samym czasie, co próbki pochodzące od pacjentów. Jest to bardzo ważne, ponieważ wynikiem testu jest wartość wskaźnika (próbka/wzorzec) tempa szybkości reakcji kinetycznej (lub nachylenie krzywej), uzyskanego z próbki pochodzącej od pacjenta i z wzorca® STAT.*

- Zaleca się, aby w czasie procedury używać 2 statywów na próbki, jednego na fiołki do przygotowywania próbek (etapy 4-6) i jednego na fiołki z odczynnikiem (etapy 7-8). Ułatwi to uniknięcie pomieszania fiołek i skażenia krzyżowego w trakcie procedury.*

- Zaleca się, aby wzorzec Fungitell® STAT umieszczać w określonym, zawsze tym samym miejscu statywu na próbki, inkubatora i czynnika. Jeśli stosowany jest instrument PKF08 i oprogramowanie BG Analytics™, należy użyć pierwszej studzienki z lewej strony, oznaczonej „Standard”.*

- Pod koniec każdego etapu mieszania należy sprawdzić wzrokowo, czy roztwór jest równomiernie wymieszany.*

- Nie należy mieszać odczynnika Fungitell® STAT zbyt intensywnie. Niezależnie od urządzenia mieszającego zaleca się maksymalne ustawienie 2000 obr./min. Nie mieszać dłużej niż 5 sekund.*

1. **Konfiguracja instrumentu**
Ustawienia mogą być różne, w zależności od modelu i oprogramowania urządzeń. Zwykle należy spełnić następujące warunki: instrument powinien mieć osiągnąć i utrzymać temperaturę 37±1°C. Instrument i oprogramowanie muszą umożliwiać odczyt gęstości optycznej w czasie (szybkości zmiany) przy dwóch długościach fal. Dokładniej rzecz biorąc, długość fal należy ustawić na 405 nm 495 nm. Ustawić tryb kinetyczny na okres odczytywania 40 minut (2400 sekund). Ustawić interwał odczytów kinetycznych na minimum, na które pozwala oprogramowanie/instrument w czasie 40 minut trwania testu i rozpocząć odczyty po włożeniu próbki. Sprawdzić w instrukcji oprogramowania jak obliczyć współczynnik (nachylenie krzywej) na podstawie zbioru danych. Do celów opisywanego testu zwykle uzyskuje się to przez zastosowanie regresji liniowej do danych kinetycznych uzyskanych w sugerowanym przedziale czasu. Ustawić obliczanie funkcji regresji liniowej w przedziale między 1900 a 2400 sekund, stosując przy tym funkcję „slice” oprogramowania. Odczytywanie należy rozpocząć bez opóźnień.

2. **Należy sprawdzić informacje dotyczące konkretnej serii wzorca Fungitell® STAT Standard**
a. Odnoszące się do konkretnego numeru serii objętości roztworów do rekonstytucji i wstępnej obróbki są podane na etykiecie opakowania wzorca Fungitell® STAT, w certyfikacie analizy produktu Fungitell® STAT, a także są dostępne na stronie internetowej ACC. Informacje te będą potrzebne do przeprowadzenia opisanego poniżej Etapu 5.
b. Zaleca się, aby przed rozpoczęciem procedury zapisać dane konkretnego numeru serii w Krótkiej instrukcji wizualnej, dostarczonej wraz z produktem Fungitell® STAT.

*Uwaga: Każdy produkt (wzorzec Fungitell® STAT oraz odczynnik Fungitell® STAT) jest testowany i udostępniany niezależnie. Ważne jest zatem, aby dla każdej pary produktów rejestrować i wykorzystywać dane dotyczące partii o konkretnym numerze.*

3. **Próbki patrzeć etykietami**

- Na każdą testowaną próbkę pobraną od pacjenta oznaczyć etykietą jedną pustą probówkę.
- Na każdą testowaną próbkę pobraną od pacjenta oznaczyć etykietą jedną probówkę z odczynnikiem Fungitell® STAT.
- Opatrzyć etykietę jedną probówkę z odczynnikiem Fungitell® STAT na wzorzec Fungitell® STAT.

4. **Przygotować próbki na próbki pobrane od pacjentów**

- Wortekosować próbki pochodzące od pacjentów co najmniej 20 sekund, aby zapewnić ich homogeniczność. *Uwaga: Proces mrożenia może powodować heterogeniczność próbek z powodu pobierania wody w związku z powstawaniem kryształów lodu, z wyłączeniem substancji rozpuszczonych.*
- Do odpowiedniej oznakowanej, pustej próbki należy dodać próbkę pobraną od pacjenta oraz alkaliczny roztwór do wstępnej obróbki w stosunku 1:4. Zalecanymi ilościami jest 50 µl próbki pobranej od pacjenta oraz 200 µl zasadowego roztworu do obróbki wstępnej. *Uwaga: Zasadowy roztwór do obróbki wstępnej przekształca glukany w formie potrójnej helisy w glukany jednoniciowe<sup>14,17</sup>, odznaczające się większą reaktywnością w teście. Ponadto odczyn zasadowy powoduje inaktywację proteaz surowicy oraz inhibitorów, mogących zakłócać działanie testu<sup>6</sup>.*
- Wortekosować przez 15 sekund i przykryć.

5. **Przygotować probówkę na wzorzec Fungitell® STAT**

- Przygotować jedną fiołkę wzorca Fungitell® STAT, używając odpowiedniej do nr partii objętości wody odczynnikowej i wortekosować przez 15 sekund.
- Dodać odpowiednią do nr partii objętości zasadowego roztworu do wstępnej obróbki. *Uwaga: Odpowiednie do konkretnego numeru serii objętości roztworów do rekonstytucji i wstępnej obróbki są podane na etykiecie opakowania wzorca Fungitell® STAT, w certyfikacie analizy produktu Fungitell® STAT, a także na stronie ACC.*
- Wortekosować przez 15 sekund i przykryć.

6. **Inkubacja wstępna w czynniku próbek**
Inkubować próbki w próbkami pobranymi od pacjentów (z etapu 4) oraz fiołkę z wzorcem Fungitell® STAT (z etapu 5) przez 10 minut w temperaturze 37°C.

7. **Przygotować próbki na odczynnik Fungitell® STAT**

- Zmieszać zawartość każdej z fiołek z odczynnikiem Fungitell® STAT (opatrzonych etykietami na etapie 3 poniżej) z 300 µl wody odczynnikowej LAL.
- Delikatnie wortekosować *nie dłużej* niż 5 sekund. *Uwaga: odczynnik Fungitell® STAT zawiera kilka aktywnych białek, potrzebnych do przeprowadzenia testu i zaleca się, aby postępować z roztworem delikatnie. Niezależnie od urządzenia mieszającego zaleca się maksymalne ustawienie 2000 obr./min. Nie mieszać zbyt intensywnie.*
- Na koniec obróbki przed inkubacją:
  - Przenieść 75 µl roztworu każdej próbki pobranej od pacjenta do odpowiadającej jej próbki w odczynniku Fungitell® STAT.
  - Przenieść 75 µl wzorca Fungitell® STAT do odpowiedniej próbki w odczynniku Fungitell® STAT.
  - Wortekosować wszystkie próbki *nie dłużej niż* 5 sekund i przykryć je.

8. **Rozpocząć test**

- Włożyć próbki do czynnika próbek, sprawdzając przy tym, czy każda znalazła się w odpowiedniej studzience.
- Rozpocząć odczyty kinetyki w temperaturze 37°C, kontynuować przez 40 minut.

9. **Zapoznać się z kryteriami kontroli jakości**

Zob. punkt Kontrola jakości poniżej i **Rysunek 2.**

10. **Interpretacja wyników**

Zob. punkt Interpretacja wyników poniżej oraz **Rysunek 3.**

**UTYLIZACJA FIOLEK PO ZAKOŃCZENIU PROCEDURY**

• Zaleca się, aby otwarte fiołki z zasadowym roztworem do wstępnej obróbki oraz wodą odczynnikową LAL wyrzucić zgodnie z procedurami obowiązującymi w danym laboratorium. Nie używać tych materiałów do więcej niż jednej serii oznaczeń, aby uniknąć możliwości zanieczyszczenia.

• W trakcie wytwarzania produktów, odczynnik Fungitell® STAT oraz wzorzec Fungitell® STAT Standard są łączone w jednej, wspólnej partii i z tego powodu nie należy używać odczynnika Fungitell® STAT i wzorca Fungitell® STAT Standard pochodzących z różnych partii produktów. Z tego powodu jeśli zostaną zużyte wszystkie fiołki odczynnika Fungitell® STAT z opakowania, zaleca się, aby wyrzucić pozostałe fiołki wzorca Fungitell® STAT, jeśli jakieś zostaną.

**KONTROLA JAKOŚCI**

• **W przypadku wszystkich numerów studzienek** należy sprawdzić, czy zostały użyte do wzorca Fungitell® STAT lub próbki tak, jak wyznaczono

• **W przypadku wzorca Fungitell® STAT**

- współczynnik korelacji (r) musi wynosić ≥ 0,980 a
- nachylenie krzywej musi się mieścić w oczekiwanym przedziale 0,00010 – 0,00024 OD/sekundę. *Jeśli wyniki testu wzorca Fungitell® STAT nie spełni kryterium nr 1 i 2, seria oznaczeń będzie nieważna i wszystkie próbki będą musiały zostać zbadane ponownie.*

• **W przypadku wszystkich próbek pobranych od pacjentów:**
**A. Ustalić, czy wynik jest poza zakresem wskaźników testu**

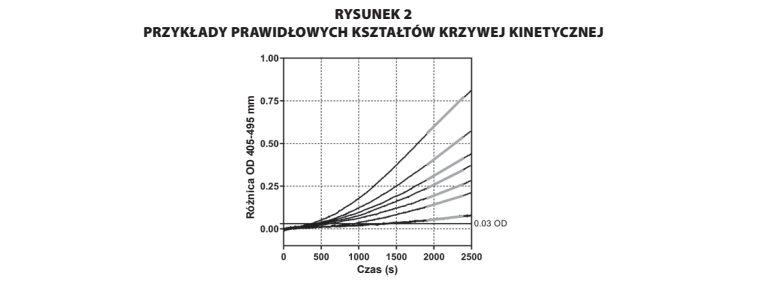
- Wynik jest prawdopodobnie poza zakresem po stronie dodatniej, jeśli:
  - nachylenie krzywej jest dodatnie i
  - krzywa szybkości reakcji osiąga 0,4 OD przed upływem 1000 sekund.
- Wynik jest prawdopodobnie poza zakresem po stronie ujemnej, jeśli:
  - krzywa kinetyczna po 500 sekundach jest dodatnia i
  - osiąga OD >0,03 i <0,01 na koniec testu.

*Jeśli wyniki testu próbki spełniają oba kryteria albo dla dodatniej, albo dla ujemnej strony poza zasięgiem, poniższe ogólne kryteria kontroli jakości nie muszą być spełnione, a wartość wskaźnika **nie** musi być obliczana. Wszystkie wyniki poza zakresem po stronie dodatniej należy zgłaszać jako „dodatnie”, a wszystkie wyniki poza zakresem po stronie ujemnej - jako „ujemne”.*

**B. Jeśli wynik nie spełnia kryteriów znajdowania się poza zakresem, należy sprawdzić ogólne kryteria kontroli jakości:**

- krzywa kinetyczna po 500 sekundach musi być dodatnia,
- krzywa kinetyczna na zakończeniu testu musi osiągać OD ≥ 0,03,
- nachylenie krzywej musi być liczbowo dodatnie,
- współczynnik korelacji (r) musi wynosić ≥ 0,980 i
- krzywa kinetyczna musi być krzywą wznoszącą się, tak, jak w przykładach podanych na **Rysunku 2.**

*Jeśli wynik testu próbki nie spełnia **wszystkich** ogólnych kryteriów kontroli jakości 1-5, jest nieprawidłowy i próbka musi zostać ponownie poddana testowi. Alternatywną możliwością jest zastosowanie innej metody.*



Może być konieczne oznaczenie próbek kontrolnych (ujemnych, w pobliżu wartości odcięcia testu i wysoce dodatnich) w celu weryfikacji prawidłowości działania odczynników i samego testu. Każdy użytkownik testu powinien wdrożyć program kontroli jakości, mający na celu zapewnienie biegłości w wykonywaniu testu zgodnie z przepisami obowiązującymi w danej instytucji.

**INTERPRETACJA WYNIKÓW**

Wyniki testu Fungitell® należy wykorzystywać jako pomoc przy diagnozowaniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Współczynniki dla próbek pobranych od pacjentów i wzorców Fungitell® STAT są uzyskiwane na podstawie obliczeń nachylenia (współczynnika) krzywej między 1900 a 2400, przy użyciu różnicy wyników OD 405 - 495 nm. Wartości wskaźnika wyników Fungitell® STAT uzyskuje się dzieląc współczynnik (ką nachylenia) krzywej dla próbek pacjentów przez współczynnik (nachylenie krzywej) wzorca Fungitell® STAT (*zob. Rysunek 3*). Wartości wskaźnika wahają się 0,4 do 3,5, pokrywając całą krzywą wzorcową (31 – 500 pg/mL) predykatu Fungitell®. Wartości wskaźnika Fungitell® STAT należy interpretować tak, jak opisano poniżej:

**WYNIK UJEMNY**

Wartości wskaźnika ≤ 0, 74 są interpretowane jako wynik ujemny.

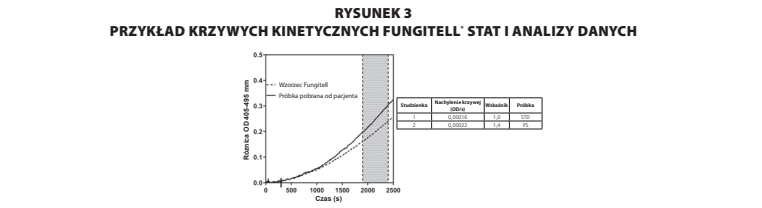
**WYNIK NIEOKREŚLONY**

Wartości wskaźnika od 0,75 do 1,1 wskazują na możliwość zakażenia grzybiczego. Zaleca się pobranie dodatkowych próbek i powtórzenie testów. Częste pobieranie próbek i testowanie zwiększają przydatność wyników do diagnozowania.

**WYNIK DODATNI**

Wartości wskaźnika ≥ 1,2 są interpretowane jako wynik dodatni. Wynik dodatni oznacza, że wykryto (1→3)-β-D-glukan. Wynik dodatni nie przesądza o występowaniu choroby i w procesie diagnozowania należy go używać w skojarzeniu z wynikami innych ocen klinicznych.

Laboratorium wykonujące test powinno poinformować lekarza zlecającego, że nie wszystkie infekcje grzybicze powodują podwyższenie stężenia (1→3)-β-D-glukanu w surowicy. Niektóre grzyby, na przykład należące do rodzaju *Cryptococcus*<sup>96,97</sup> wytwarzają bardzo niewielkie ilości (1→3)-β-D-glukanu. *Pleśniakowce*, takie jak *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus*<sup>17</sup> nie wytwarzają, o ile wiadomo, (1→3)-β-D-glukanu. Podobnie *Blastomyces dermatitidis*, w fazie drożdży wytwarza niewiele (1→3)-β-D-glukanu i u pacjentów z blastomykozą w teście Fungitell® STAT <sup>17</sup> występują zwykle nieoznaczalne stężenia (1→3)-β-D-glukanu.



Obszar podświetlony na szaro jest obszarem wyznaczania nachylenia krzywej (1900 do 2400 sekund (s)), linia ciągła przedstawia przykładową próbkę pobraną od pacjenta (PS), a linia przerywana odpowiada wzorcowi Fungitell® STAT (STD). Kąt nachylenia krzywej dla próbki (tj. 0,00022 OD/s) podzielony przez kąt nachylenia krzywej dla wzorca 80 pg/ml Fungitell® STAT (tj. 0,00016 OD/s) pozwala uzyskać dla próbki wskaźnik 1,4. W tym zastosowaniu kąt nachylenia i współczynnik krzywej są synonimami.

**OGNACZENIA TESTU**

1. Na stężenie tego analitu w surowicy mogą mieć wpływ lokalizacja tkanek objętych zakażeniem grzybiczym<sup>98</sup>, otorbiniec oraz ilość (1→3)-β-D-glukanu, wytwarzanego przez niektóre grzyby. Zmniejszona zdolność do przekazywania (1→3)-β-D-glukanu do krwiobiegu może zmniejszać zdolność do wykrywania niektórych zakażeń grzybiczych. *Cryptococcus spp.* wytwarzają niewielkie ilości (1→3)-β-Dglukanu<sup>96,97</sup>. *Pleśniakowce*, w tym *Absidia spp.*, *Mucor spp.* i *Rhizopus spp.* o ile wiadomo nie wytwarzają (1→3)-β-D-glukanu<sup>17</sup> *Blastomyces dermatitidis* w fazie drożdży wytwarza niewielkie ilości (1→3)-β-D-glukanu i wyniki testu w przypadku zakażenia tymi grzybami są zwykle ujemne<sup>94</sup>. Informacje te należy przekazać lekarzowi zlecającemu przeprowadzenie testu.

2. U niektórych osób obserwuje się podwyższone wartości wskaźnika (1→3)-β-D-glukanu, które mieszczą się w zakresie wyników nieokreślonych. W takich przypadkach zaleca się przeprowadzenie dodatkowych testów kontrolnych.

3. Częstość wykonywania testów pacjentów zależy od względnego zagrożenia zakażeniem grzybiczym. W przypadku pacjentów z grupy wysokiego ryzyka zaleca się pobieranie próbek co najmniej dwa-trzy razy na tydzień.

4. Wyniki dodatnie uzyskiwano wśród pacjentów poddawanych hemodializom<sup>99</sup>, pacjentów leczonych niektórymi preparatami krwi frakcjonowanej, takimi jak albuminy i immunoglobuliny surowicy oraz u pacjentów stykających się z gazą lub gąbkami chirurgicznymi zawierającymi gluklan. Po narażeniu pacjentów na kontakt z (1→3)-β-D-glukanem zawartym w gąbkach i gazach chirurgicznych należy poczekać 3 – 4 dni na powrót do wcześniejszego stężenia (1→3)-β-D-glukanu w surowicy<sup>102</sup>. Przy pobieraniu próbek od pacjentów po zabiegach chirurgicznych należy wziąć pod uwagę te uwarnukowania.

5. Próbki pozyskiwane metodą nakłucia palca lub pięty nie są dopuszczalne, gdyż wykazano, że zwilżony alkoholem gazik używany do przygotowania miejsca pobrania próbki (oraz potencjalnie gromadzenie się krwi na powierzchni skóry) powoduje zanieczyszczenie próbek. W przeprowadzonych dotychczas badaniach nie zaobserwowano różnic między próbkami uzyskanymi metodą nakłucia naczyzna żylnego lub włknięcia centralnego.<sup>25,26</sup>

6. Stężenia testowe określono w odniesieniu do dorosłych pacjentów. Stężenia prawidłowe i odcięcia dla niemowląt i dzieci są w dalszym ciągu przedmiotem badań.<sup>27,28</sup>

**SUBSTANCJE ZAKŁÓCAJĄCE PRZEBIEG TESTU**

Poniższe stany próbki mogą być przyczyną niedokładnych wyników testu Fungitell® STAT:

- Hemoliza
- Zmętnienie próbki spowodowane lipemią
- Występowanie znacznej ilości bilirubiny
- Mętna surowica
- Podwyższone stężenie immunoglobuliny G, które przykładowo występuje w surowicy w przebiegu szpiczaka mnogiego, może skutkować wytrąceniem się osadu w obrębie mieszaniny reakcyjnej po dodaniu odczynnika Fungitell® STAT do poddanej wstępnej obróbce surowicy<sup>99</sup>.

**WARTOŚCI OCZEKIWANE**

Wieloośrodkowe, prospektywne badanie, przeprowadzone w celu przygotowania charakterystyki testu Fungitell (predykat) wykazało, że poziom β-glukanu jest podwyższony w przypadku wielu zakażeń grzybiczych. Kiedy przy stężeniu wynoszącym co najmniej 80 pg/ml występują objawy przedmiotowe i podmiotowe, wartość predykyjna występowania infekcji grzybiczej u pacjenta mieści się w zakresie od 74,4 do 91,7%. W przypadku braku objawów przedmiotowych i podmiotowych przy stężeniu mniejszym niż 60 pg/ml, wartość predykyjna ujemna wahała się od 65,1% do 85,1%.

Wartości wskaźnika β-glukanu Fungitell® STAT ≥ 1,2 są interpretowane jako wynik dodatni odpowiednio do punktu odcięcia dla produktu Fungitell® 80 pg/ml, natomiast wartości wskaźnika ≤ 0, 74 są interpretowane jako wyniki ujemne odpowiednio do punktu odcięcia dla produktu Fungitell® 60 pg/ml.

**CHARAKTERYSTYKA PARAMETRÓW**

**TESTY PORÓWNAWCZE METOD**

Do celów badania porównawczego metod użyto pozbawionych elementów umożliwiających identyfikację, zamrożonych próbek surowicy, pobranych od pacjentów w ramach rutynowej opieki klinicznej w określonej populacji i otrzymanych przez Beacon Diagnostics® Laboratory, Inc do przeprowadzenia testu Fungitell®. Beacon Diagnostics® Laboratory, Inc jest certyfikowaną przez CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments), laboratoryjną częścią ACC. Do badania włączono 488 próbek surowicy, pobranych od pacjentów i pozbawionych elementów umożliwiających identyfikację. Próbki zawierały (1→3)-β-D-glukan w stężeniach mieszczących się w całym przedziale stężeń opisywanych przez krzywą wzorcową Fungitell®. Należało do nich 309 próbek, które mieściły się w obszarze ujemnym wyników testów Fungitell®, 143 próbek mieszczących się w obszarze dodatnim wyników testu Fungitell® i 36 próbek w tej części zakresu, która odpowiadała wynikom nieokreślonym testu Fungitell® (Tabela 2). Wszystkie próbki były badane zarówno przy użyciu testu Fungitell® STAT, jak i testu Fungitell®. Gdy z analizy wylączono próbki mieszczące się w obszarze odpowiadającym nieokreślonym wynikom testu Fungitell® STAT, pozostało 290 próbek do analizy odsetka zgodności wyników ujemnych i 119 próbek do analizy odsetka zgodności wyników dodatnich

<b>TABELA 2</b> <b>EFEKTYWNOŚĆ TESTU FUNGITELL® STAT W PORÓWNIANIU DO TESTU FUNGITELL®</b>					
		Wynik Fungitell®			
		Ujemny	Nieokreślony	Dodatni	Suma
Fungitell® STAT	Ujemny	283	17	1	301 (61,7%)
	Nieokreślony	19	17	24	60 (12,3%)
	Dodatni	7.	2	118	127 (26,0%)
	Suma	309 (63,3%)	36 (7,4%)	143 (29,3%)	488 (100%)
		NPA: 97,6%* (283/290) 95% CI: (95,4, 99,9)		PPA: 99,2%* (118/119) 95% CI: (95,4, 99,9)	

*\*Wyniki nieokreślone (tj., niejednoznaczne) nie zostały włączone do analizy; jeśli wszystkie wyniki nieokreślone uznano za wyniki niezgodne (tj., fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne), rezultaty są następujące: PPA - 73,8% (118/160), 95% CI: (66,4%, 80,0%); NPA - 91,0% (283/311), 95% CI: (87,3%, 93,7%)*

**ODSETEK ZGODNOŚCI WYNIKÓW UJEMNYCH**

Dwieście osiemdziesiąt trzy (283) z 290 próbek, które były ujemne w urządzeniu Fungitell® było także ujemnych w teście Fungitell® STAT. Obliczony metodą predykyjną odsetek zgodności wyników ujemnych (NPA) wyniósł 97,6% (95% przedział ufności: 95,4%, 99,9%) (Tabela 2)

**ODSETEK ZGODNOŚCI WYNIKÓW DODATNICH**

Sto osiemnaście (118) ze 119 próbek, które były dodatnie w urządzeniu Fungitell® było także dodatnich w teście Fungitell® STAT. Obliczony metodą predykyjną Fungitell® \*odsetek zgodności wyników dodatnich (PPA) wyniósł 99,2% (95% przedział ufności: 95,4%, 99,9%) (Tabela 2)

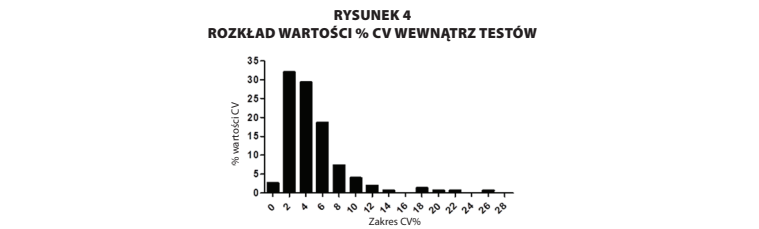
**BADANIE POWTAŻALNOŚCI**

Test Fungitell® STAT oceniano pod kątem powtarzalności, dodając do próbek ludzkiej surowicy (1→3)-β-D-Glukan *Saccharomyces cerevisiae* i uzyskując wzorzecowy panel, w skład którego wchodziły próbka słabo ujemna, wysoce ujemna (tuż poniżej dolnego punktu odcięcia 0,74), nieokreślona (niejednoznacznych), słabo dodatnia (tuż powyżej górnego punktu odcięcia 1,2) i wysoce dodatnia (~2x powyżej górnego punktu odcięcia 1,2). Panel został przekazany do trzech laboratoriów CLIA do badania przy użyciu testu Fungitell® STAT. Każde laboratorium dostarczyło 150 punktów danych (tj. 5 próbek x trzy badania w serii x dwóch operatorów przeprowadzających każdego dnia test x 5 dni), a zatem łącznie uzyskano 450 punktów danych. Średnie wartości wskaźnika uzyskane w badaniu przedstawione w Tabeli 3 poniżej pochodzą z danych dostarczonych przez te laboratoria. W kolumnie odsetków dodatnich zamieszczone odsetek próbek dla danego zestawu panelu, które znalazły się w strefie dodatniej. We wszystkich trzech laboratoriach wyniki odsetka wyników dodatnich wyniosły 1,1% w przypadku próbki słabo ujemnej, 0% dla próbki wysoce ujemnej, 3,3% dla próbki nieokreślonej, 96,7% dla próbki słabo dodatniej i 100% dla próbek wysoce dodatnich.

Element panelu	Średni wskaźnik	Odchylenie standardowe	% CV	Odsetek dodatnich (Liczba dod./Liczba test.)
Słabo ujemna	0,55	0,10	20,4%	1,1% (1/90)
Wysoce ujemna	0,75	0,08	11,1%	0% (0/90)
Nieokreślona	0,94	0,10	11,1%	3,3% (3/90)
Słabo dodatnia	1,6	0,30	18,7%	96,7% (87/90)
Wysoce dodatnia	2,6	0,40	15,4%	100% (90/90)

**DOKŁADNOŚĆ**

Zróżnicowanie wewnątrz testów (tj. %CV) mieściło się w przedziale 0,4% to 26,8%, a zróżnicowanie między testami wahało się od 11 do 20,4%. W odniesieniu do zakresu zróżnicowania wewnątrz testów, na rysunku **Figure 4** poniżej przedstawiono rozkład zakresu % CV Łącznie 94% wartości CV wyniosło 10% lub mniej, a 75% wartości CV wyniosło 6% lub mniej.



**METAANALIZY**

Ponadto, opublikowano wiele recenzowanych artykułów na temat diagnozowania inwazyjnych chorób grzybiczych na podstawie zawartości (1→3)-β-D-glukanu w surowicy, w tym metaanalizy wyników diagnostycznych<sup>90,91,92,93,94,95,96,97</sup>.

**LEGENDA SYMBOLI**

	„Termin przydatności do użycia”		„Ograniczenia dotyczące temperatury”
	„Zawiera ilość materiału wystarczająco do N testów”		„Producent”
	„Kod partii”		„Zapoznaj się z instrukcją stosowania”
	„Wyrób medyczny przeznaczony do diagnostyki in vitro”		Autoryzowany przedstawiciel”
	„Nr katalogowy”		„Znak CE”

<sup>R</sup>only „Tylko na receptę”

	Nr telefonu: (508) 540-3444 Bezpłatna linia: (888) 395-2221 Faks: (508) 540-8680 Dział pomocy technicznej: (800) 848-3248 Dział obsługi Klienta: (800) 525-8378
--	---

**EC REP** Associates of Cape Cod Europe GmbH, Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Germany

Przedstawicielstwo w Wlk. Brytanii: Associates of Cape Cod, Int'l, Inc, Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, UK

Sponsor australijski: Emerge Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Australia

**Piśmiennictwo**

- Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. Medical Mycology 44: 267-272.
- De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin. Inf. Dis. 46: 1813-1821.
- Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transp. Infectious Dis. 1999: 1:247-261.
- 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., Horiuchi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 345: 17-20.
- 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: 4 (Suppl. 3):32-37
- Lass-Flori, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.
- Nucci, M. and Anaissie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.
- Litvintseva, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grgurich, D.E., Kerkering, 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.

11. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjijan, 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.

12. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.

13. 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.

14. 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 ameocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.

15. 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.

16. 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.

17. Binder, U., Maurer, E., and Lass-Flori, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Lin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl.6): 60-66.

18. Girouard, G., Lachance, C., and Pelletier, R. 2007. Observations of (1→3)-β-D-Glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. J. Med. Mycology 56: 1001-1002.

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., Iden, 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., Coceanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-gluacan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.

23. Held J, Wagner D β-D-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in Pneumocystis jirovecii pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1118-22.

24. 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.

25. Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I., and Mayer, J. Difficulties in using 1,3-β-(beta)-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies–high frequency of false-positive results and their analysis. J. Med. Microbiol. 2010; 59:1016-22.

26. Posteraro B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi,M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguinetti, 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.

27. 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.

28. Goudjił, S., Kongolo, G., Dusol, L., Imestouen, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. J. of Maternal-Fetal and Neonatal Med. 26: 44-48.

29. 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)-β-D-glucan assays for patients with multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia. J.Clin. Microbiol. 50:1054-6.

30. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 52:750-70.

31. 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.

32. Lamoht 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 (ECLL-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633-43.

33. Onishi AI, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012; 50:7-15.

34. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39-49.

35. 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.

36. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39-49.

37. He 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, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role