

Analyse af (1→3)-β-D-glukan i serum

FUNGITELL STAT®

Besøg www.fungitell.com for en brugsanvisning på dit sprog.

Fungitiel STAT® analysen er en proteasezymogen-baseret kolorimetrisk analyse til kvalitativ påvisning af (1→3)- β -D-glukan i serum hos patienter med symptomer på, eller medicinske tilstande, der gør patienter modtagelige for invasiv svampeinfektion. Serumkoncentrationen af (1→3)- β -D-glukan, en primær komponent i cellevæggen i forskellige artede medicinske vigtige svampetyper¹, kan anvendes som en hjælp ved diagnosticering af dybtgående mykoser og fungæmier². Et positivt resultat angiver ikke, hvilken svampeslæggt kan være årsag til infektionen.

Svampeinfektioner fra opportunistiske patogener ses i stigende grad, og især hos immunsupprimerede patienter^{3,4,5}. Invasive svampesygdomme, såsom opportunistiske infektioner, forekommer hyppigt hos patienter med hæmatologiske maligniteter eller aids og er årsagen til et voksende antal nosokomiale infektioner, især blandt modtagere af organtransplantationer og andre patienter, der får immunsupprimerende behandlinger^{6,7}. Mange svampesygdomme erhverves ved indånding af svampesporer fra jord, planteaffald, luftbehandlingsystemer og/eller udsatte områder. Nogle opportunistiske svampe er til stede i/på menneskehud, tarmkanal og slimhinder^{8,9}. Diagnosticering af invasive mykoser og fungæmier baseres normalt på ikke-spesificke diagnostiske eller røntgenteknikker. Biologiske markører for svampeinfektioner er for nylig blevet gjort tilgængelige som diagnostiske metoder².

Fungitell STAT® (katalog-nr. FT007, Associates of Cape Cod, Inc.) analysen er et modificeret design af Fungitell® (katalog-nr. FT001, Associates of Cape Cod, Inc. eller ACC) analysens format. Fungitell STAT® analysen (2019 CE-mærket produkt) blev udviklet for at imødekomme behovet for en engangsanalyse og en mindre sæstørrelse i forhold til 96-brønds plade-formatet i Fungitell® (USA-prædikat og 2008 CE-mærket produkt) analysen.

Diagram illustrating the coagulation cascade:

- Endotoxin (LPS) activates Factor C.
- Factor C activates Factor B.
- Factor B, along with Factor G and (1-3)- β -D-glucan, activates Factor G.
- Factor G activates the Pro-coagulation enzyme.
- The Pro-coagulation enzyme converts Boc-Leu-Gly-Arg-pNA (artificial substrate) into Boc-Leu-Gly-Arg + pNA.
- An "Inactive lane" is also indicated.

Tabel 1. Fungitell STAT® indeksområder	
Resultat	Indeksværdi
Negativ	$\leq 0,74$
Ubestemmelig	0,75-1,1
Positiv	$\geq 1,2$

De følgende materialer, som følger med hvert produkt, er tilstrækkelige til i alt 10 reaktioner (baseret på 10 hætteglas med Fungitell STAT[®] reagens). Hvert produkt indeholder også 5 hætteglas med Fungitell STAT[®] standard.

- Alle materialer skal være fri for interfererende glukon.

- **Brugervejledninger kan downloades på ACC's website: www.funqitell.com.**

6. **Opbevaring af reagenser**
- Opbevar sættet, som leveret i den originale emballage, ved 2-8 °C på et mørkt sted.
 - Fungitell STAT[®] reagens og Fungitell STAT[®] standard er fremstillet til at blive brugt op til 1 time efter rekonstituering.
7.  **Advarsler og forholdsregler**
- Ingen materialer må pipetteres med munden. Undgå at ryge, spise og drikke i områder, hvor der håndteres prøver eller sætreagenser.
 - Følg driftsbestemte og lokale sikkerhedsforskrifter.
 - Brug beskyttelseshandsker ved håndtering af biologiske prøver, der kan være infektiøse eller farlige. Den behandskede hånd skal til enhver tid betragtes som kontamineret. Hold din behandskede hånd væk fra dine øjne, mund og næse. Brug øjenbeskyttelse og medicinsk mundbind, hvis der er mulighed for aerosolforurening.
 - Produkter med beskadiget indhold må ikke anvendes.
 - Bortskaffelse: Rester af kemikalier og forberedelser betragtes almindeligvis som risikoaffald. Bortskaffelse af denne type affald er reguleret af nationale og regionale love og forskrifter. Kontakt de lokale myndigheder eller affaldshåndteringsvirksomheder for råd om bortskaffelse af risikoaffald.
 - **Sikkerhedsdatabladene** for Fungitell STAT[®] reagens, Fungitell STAT[®] standard, LAL-vand af reagenskvalitet og alkalisk forbehandlingsopløsning kan downloades fra ACC's website: www.accusia.com.

- Etabler et rent miljø at udføre analysen i.
- Bemærk, at glukon - såvel som svampekontamination fra menneskekroppen, beklædning, beholdere, vand og luftbåret støv - kan interferere med Fungitell STAT® analysen.
- Mulige kontamineringskilder inkluderer celluloseholdige materialer, såsom gaze, papirservietter og pap, glaspipetter med bomuldspropper og pipettespidser med cellulosefiltre. Kirurgisk gæzevæv og tamponer kan også udskille store mængder af (1→3)-β-D-glukon^{21,22}. Se afsnittet Begrænsninger for andre patientrelaterede kontamineringskilder for testen.
- Brug straks de åbnede hætteglas med alkalisk forbehandlingsopløsning og LAL-reagensvand, og hvis potentiel kontamination er et problem, må disse materialer ikke genanvendes.
- Fungitell STAT® reagenset og Fungitell STAT® standarden sælges som en parret batch. Derfor må der aldrig bruges komponenter tilhørende Fungitell STAT® reagens og Fungitell STAT® standard fra andre produktbatches. Det tilrådes derfor at bortskafe eventuel overskydende Fungitell STAT® standarder, så snart alle Fungitell STAT® reagenshætteglas i en pakke er brugt op.
- Brug ikke materialer efter udløbsdatoen.

- Indsamling af blodprøver og forberedelse af serum skal ske i henhold til gældende lokale forskrifter. Prøvetagning: Blodprøver skal indsamles i sterile serumklargøringsglas eller serumseparationsglas (SST) til klargøring af serum.
- Opbevaring af prøver: Serumprøver kan opbevares ved 2-8 °C i op til 15 dage eller nedfryses ved -20 °C i op til 27 dage eller -80 °C i op til 4 år.
- Mærkning af prøver: Prøver skal mærkes tydeligt i overensstemmelse med behandlingsinstitutionens (laboratoriets) godkendte praksis.

- Brug god laboratoriepraksis i henhold til gældende lokale forskrifter. Denne analyse er følsom over for kontaminering og unøjagtig pipettering.
- Det tilrådes at arbejde i et biologisk sikkerhedsskab for at beskytte operatøren under arbejdet med serumprøver og for at mindske risikoen for kontamination med miljørelateret ($1 \rightarrow 3$) β -D-glukan under proceduren.
- Det tilrådes at anbringe vortexmixeren i det biologiske sikkerhedsskab (så længe den nødvendige luftgenstrømning opretholdes) for at mindske unødige flytninger af hætteglas ind og ud af det biologiske sikkerhedsskab.
- Brugen af lange pipettespidser tilrådes for at beskytte bedre mod krydskontaminering mellem hætteglas.
- En Fungitell STAT[®] standard (rød hætte og mærket med rød linje) skal altid behandles under de samme forhold og på samme tidspunkt som patientprøven/patientprøverne i en kørsel. Dette er yderst vigtigt, da resultatet af analysen er et indeks (prøve/standard) af de kinetiske reaktionsrater (eller hældninger, OD/sek) fra patientprøven og Fungitell STAT[®] standarden.
- Det tilrådes at bruge separate hætteglasstativer under proceduren. Et til hætteglassene til prøveforberedelse og et til hætteglassene med reagens, så der ikke opstår forvirring og krydskontaminering.
- Det tilrådes at anbringe Fungitell STAT[®] standarden i én bestemt position og altid samme position i hætteglasstativet, inkubatoren og læseren. Brug den første brønd til venstre i PKF08-læseren, der er mærket "Standard".
- Bekræft visuelt, til sidst i hvert blandingstrin, at opløsningen er blandet ensartet.

Nedenstående procedurer er allerede programmeret, når du bruger PKF08-instrumentet og BG Analytics® softwaren: Instrumentindstilling, evaluering af resultater og kvalitetskontrol. Se BG Analytics® softwarens brugervejledning eller kontakt fabrikanten for yderligere oplysninger.

8.1.2 Hvis der bruges et andet instrument og anden software, skal følgende betingelser være opfyldt:

- a. Instrumentet skal være i stand til at opnå og bibeholde en temperatur på $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- b. Instrumentet og software skal være i stand til at aflæse optisk densitet over tid (kinetisk tilstand) ved to bølglængder. Disse bølglængder skal specifikt være indstillet til 405 nm og 495 nm.
- c. Indstil den kinetiske tilstand til en aflæsningslængde på 40 minutter (2.400 sekunder). Indstil det kinetiske aflæsningsinterval til det minimum, som er tilladt af softwaren/på instrumentet.
- d. Målingen skal startes straks efter isætning af prøve.
- e. If. softwaremanualen, for at se hvordan man beregner målingen af en rate (hældning) fra datasættet. For denne test vil det almindeligvis opnås ved at udføre en lineær regression på de kinetiske data over den anbefalede tidsramme. Indstil beregningen af den lineære regression til at blive udført over intervallet mellem 1.900 og 2.400 sekunder ved brug af softwarens "sni"-funktion.

- Sæt mærkat på ét tomt hætteglas for hver patientserumprøve, der skal analyseres.
- Sæt mærkat på ét Fungitell STAT® reagenshætteglas for hver patientserumprøve, der skal analyseres.
- Sæt mærkat på ét Fungitell STAT® reagenshætteglas til Fungitell STAT® standarden.

a. Bland patientserumprøve i vortexmixer i mindst 20 sekunder for at sikre ensartethed.
Bemærk: Fryseprocessen kan give prøveheterogenitet, som skyldes vandindvinding til det voksende iskrald, hvorved de opløste stoffer udelukkes.

b. Tilsæt patientserumprøven og den alkaliske forbehandlingsopløsning i forholdet 1:4 til det relevante mærkede tomme hætteglas. Anbefalede volumener er 50 µl patientprøve og 200 µl alkalisk forbehandlingsopløsning.
Bemærk: Den alkaliske forbehandlingsopløsning konverterer tredobbelte helix-glukaner til enkeltstrengede glukaner^{14,15}, som er mere reaktive i analysen. Desuden tjener den alkaliske pH som et middel til inaktivering af serumproteaser og inhibitorer, der kan påvirke analysen²⁴.

c. Bland i vortexmixer i 15 sekunder og dæk reagensglas til.

Bemærk: Hvert produkt (Fungitell STAT® standard og Fungitell STAT® reagens-parret) analyseres og frigives selvstændigt. Det er derfor vigtigt at bruge Lømr.-mængderne af rekonstitueret og alkalisk forbehandlingsopløsning. Disse kan findes på mærkaten på Fungitell STAT® standarden, på Fungitell STAT® produktets analysecertifikat og er tilgængeligt på ACC's website. Anbefaling: Skriv disse oplysninger ned på den medfølgende Kort oversigt, inden analysen startes.

- Rekonstituer et hætteglas Fungitell STAT® standard med det løtommerspecifikke volumen LAL-vand af reagenskvalitet, og bland i vortexmixer i 15 sekunder.
- Tilsæt de løtommerspecifikke volumen alkaliske forbehandlingsopløsning.
- Bland i vortexmixer i 15 sekunder og dæk reagensglasset til.

Inkubér hætteglassene med patientserumprøver (fra trin 8.3) og hætteglasset med Fungitell STAT® standard (fra trin 8.4) i 10 minutter ved 37 °C.

 Forsigtig, hætteglassene er skrøbelige. Skulle der trænge glasskår og væske ind i en målestation på PKF08, skal I kontakte teknisk service hos Associates of Cape Cod, Inc.

- a. Rekonstruer hvert hætteglas med Fungitell STAT® reagens (påsat mærket i trin 8.2 ovenfor) med 300 µl LAL-vand af reagenskvalitet.
- b. Bland forsigtigt med vortexmixer i højest 5 sekunder.
Bemærk: Fungitell STAT® reagentset indeholder en række aktive proteiner, der er nødvendige for analysen. Det tilrådes, at opløsningen håndteres med forsigtighed. En maks. indstilling på 2.000 omdr./min. anbefales for alle vortexmixere. Må ikke blandes for meget.
- c. Til sidst under præinkubationen:
 - Overfør 75 µl opløsning fra hver patientserumprøve til de tilsvarende Fungitell STAT® reagenshætteglas.
 - Overfør 75 µl Fungitell STAT® standard til de tilsvarende Fungitell STAT® reagenshætteglas.
 - Bland alle hætteglas med vortexmixer i højest 5 sekunder, og dæk til.

- Sæt hætteglassene i hætteglaslæseren, og kontrollér samtidigt, at hvert hætteglas er i den tilsigtede brønd.
- Start den kinetiske aflæsning i en periode på 40 minutter ved 37 °C.

Resultaterne af Fungitell STAT® analysen anvendes som en hjælp til diagnosticering af en invasiv svampeinfektion. Standardraterne for patientprøven og Fungitell STAT® er udledt fra beregningen af hældningen (raten) mellem 1.900 og 2.400 fra Delta OD 405-495 nm resultaterne. Resultaterne af Fungitell STAT® indekstest opnås ved at dividere hældningen af patientprøven med hældningen af Fungitell STAT® standarden (se Figur 2).



- Softwaren foretager automatisk en kontrol af kvalitetskriteriet. Resultatet fremgår af den endelige rapport.
- For de testkørsler der lykkes, udregner BG Analytics® softwaren en indeksværdi for hver prøve eller tildeler et klart negativt eller positivt resultat til prøven.
- Hvis softwaren viser nogle som helst tegn på ugyldige parametre i evalueringen af resultatet, skal anvisningerne i BG Analytics® softwaremanualen følges.

Bekræft, at alle kvalitetskriterier er opfyldt.

10. Kvalitetskontrol

Nedenfor ses kvalitetskontrolkriterierne for Fungitell STAT® standarden og resultaterne af patientserumprøve, herunder eksempler på den forventede facon af den kinetiske kurve. Disse kvalitetskontrolkriterier blev valideret under de forsøg, der er beskrevet i afsnittet Ydelsesfunktioner.

- **Det gælder alle brøndnumrene**, at nummertildelingen for Fungitell STAT® standarden eller prøven skal bekræftes

- **Før Fungitell STAT® standardens resultat,**
 1. skal korrelationskoefficienten (r) være $\geq 0,980$ og
 2. hældningen skal ligge inden for det forventede hældningsområde på 0,00010-0,00024 OD/sekund.

Hvis Fungitell STAT® standardens resultat ikke opfylder kriterium nr. 1 og nr. 2, er kørslen ugyldig, og alle prøverne skal forberedes forfra og analyseres.

- Gør følgende for alle patientprøveresultater:**
- A. Bestem, om resultatet måske er uden for analysens måleområde**
- Resultatet er sandsynligvis uden for området på den positive side, hvis:
 - Y-skæringspunktet er positivt og
 - Den kinetiske kurve passerer 0,4 OD før 1.000 sekunder.
 - Resultatet er sandsynligvis uden for området på den negative side, hvis:
 - Den kinetiske kurve er positiv efter 500 sekunder og
 - har en OD på $\geq 0,00$ og $< 0,07$ ved afslutningen på analysen.

Hvis prøveresultatet opfylder begge kriterier for enten positiv eller negativ "uden for område", er det ikke nødvendigt, at de nedenstående generelle kvalitetskontrolkriterier er opfyldt, og indekssværdien skal ikke beregnes. Alle "uden for område" resultater på den positive side skal rapporteres som "Positiv", og alle "uden for område" resultater på den negative side skal rapporteres som "Negativ".

- 34.Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633-43.
- 35.Onishi A1, 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.
- 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.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.
- 39.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 $\rightarrow$ 3)- β -D Glucan. PLoS One. 2016 Oct 20;11(10):e0164978. doi: 10.1371/journal.pone.0164978. eCollection 2016.
40. Finkelman M. Specificity Influences in (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-Glucan-Supported Diagnosis of Invasive Fungal Disease. J. Fungi (Basel) 2020 Dec 29;7(1):14