

**Test na (1→3)-β-D-Glukan v séru**

**TEST FUNGITELL®**

### Návod k použití

124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02556 USA

Telefon: (508) 540-3444  
 Bez poplatku: (888) 395-2221  
 Fax: (508) 540-8680  
 Technická podpora: (800) 848-3248  
 Zákaznické služby: (800) 525-8378

K only

IVD

Σ

42

CE

PN001268-cs Rev11 REF FT001 2021-12-14

**Návod k použití** ve vašem jazyce vyhledejte na [www.accusia.com](http://www.accusia.com).  
*Tento produkt je určen pouze pro diagnostické použití in vitro a pro profesionální použití.*

**1. Určené použití**  
**Test Fungitell®** je kolorimetrický test založený na proteázovém zymogenu pro kvalitativní detekci (1→3)-β-D-glukanu v séru pacientů, kteří mají příznaky invazivní plísňové infekce nebo kteří jsou k takové infekci náchylní na základě jejich zdravotního stavu. Sérovou koncentraci (1→3)-β-D-glukanu, což je hlavní složka buněčné stěny různých plísňů důležitých z lékařského hlediska<sup>1</sup>, lze použít jako pomůcku při diagnostice hlubokých mykóz a fungemií<sup>2</sup>. Pozitivní výsledek neindikuje, který rod plísní může způsobovat infekci.

Titry (1→3)-β-D-glukanu je třeba používat společně s dalšími diagnostickými postupy, například mikrobiologickou kultivací, histologickým vyšetřením nebo bioptickými vzorky a radiologickým vyšetřením.

**Důležité**

Tyto informace poskytněte objedávajícím lékařůi: *Některé plísně, např. rod *Cryptococcus*, který produkuje velmi nízké hladiny (1→3)-β-D-glukanu, nemusí zvýšit hladinu (1→3)-β-D-glukanu v séru dost na to, aby ho tento test detekoval<sup>3,4</sup>. Nízké titry (1→3)-β-D-glukanu v séru byly pozorovány také u infekci plísněmi řádu *Mucorales*, např. *Aspidia*, *Mucor* a *Rhizopus*<sup>5,6</sup>, u kterých není známo, že by produkovaly (1→3)-β-D-glukan. Dále také kvasinková fáze *Blastomyces dermatitidis* produkuje málo (1→3)-β-D-glukanu a test ji nemusí detekovat<sup>7</sup>.*

Do hlášení výsledků testu Fungitell® zahrňte toto prohlášení.

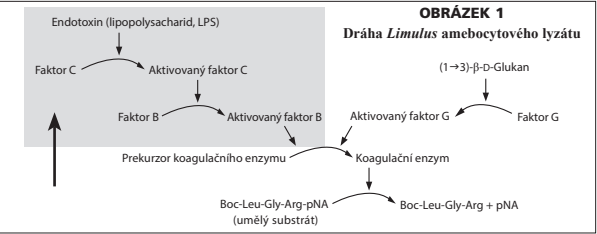
**2. Souhrn a vysvětlení**  
 Výskyt plísňových infekcí oportunními patogeny, obzvláště u pacientů se sníženou imunitou, se zvyšuje<sup>6,8</sup>. Invazivní plísňová onemocnění, jako oportunní infekce, se často vyskytují u pacientů s hematologickou malignitou a u pacientů s AIDS a jsou příčinou rostoucího počtu nozokomiálních infekcí, obzvláště u příjemců transplantovaných orgánů a dalších pacientů užívajících imunosupresivní terapii<sup>9,10</sup>. Mnohá plísňová onemocnění vznikají vdechováním plísňových spor z půdy, zbytků rostlin, klimatizačních systémů a/nebo exponovaných povrchů. Některé oportunní plísně jsou přítomny v lidské kůži (nebo na jejím povrchu), ve stvech a sliznicích<sup>11,12</sup>. Diagnózy invazivních mykóz a fungemií jsou obvykle založeny na nespecifických diagnostických nebo radiologických technikách. K dostupným diagnostickým metodám nedávno přibýly biologické markery plísňové infekce<sup>3</sup>.

Mezi oportunní plísňové patogeny patří *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* a *Pneumocystis jirovecii*. Test Fungitell® detekuje (1→3)-β-D-glukan produkovaný těmito a dalšími organismy<sup>13,14,15</sup>.

**3. Princip metody**  
 Test Fungitell® měří (1→3)-β-D-glukan. Test je založen na modifikaci dráhy *Limulus* ameboeytového lyzátu (LAL).

Obrázek 1. Reagencie Fungitell® je modifikována tak, aby nereagovala s bakteriálními endotoxiny a reagovala pouze s (1→3)-β-D-glukanem prostřednictvím faktorem G mediované strany dráhy. (1→3)-β-D-glukan aktivuje faktor G, zymogen serinové proteázy. Aktivovaný faktor G přeměňuje neaktivní prekursor koagulačního enzymu na aktivní koagulační enzym, který štěpí para-nitroimidil (pNA) z chromogenického substrátu peptidů Boc-Leu-Gly-Arg-pNA a vytváří chromofor, para-nitroanilin, který je absorbován při 405 nm. Níže popsaný kinetický test Fungitell® je založen na stanovení rychlosti zvyšování optické hustoty produkované vzorkem. Tato rychlost je interpretována proti standardní křivce k získání odhadu koncentrace (1→3)-β-D-glukanu ve vzorku.

**4. Materiály dodávané v soupravě Fungitell®**  
 Souprava Fungitell® je určena pro diagnostické použití in vitro. Níže uvedené materiály dodávané s každou soupravou vystačí k testu 110 jamek na dvou mikrotitračních destičkách (55 jamek v každé destičce):



- Reagencie Fungitell®, lyofilizovaný LAL specifický pro (1→3)-β-D-glukan (dvě injekční lahvičky). *Reagencie Fungitell® obsahuje Limulus ameboeytový lyzát (tj. z ostrorep) a kolorimetrický substrát Boc-Leu-Gly-Arg-pNA. Neobsahuje lidské ani savčí proteiny.*
- Rekonstituční pufr Pyrosol® (dvě injekční lahvičky). Další injekční lahvičky rekonstitučního pufru Pyrosol (katalogové číslo BC051) lze koupit zvlášť. *Pufr je tvořený 0,2M Tris puforem.*
- Glukanový standard, lyofilizovaný (1→3)-β-D-glukan z pachymanu (dvě injekční lahvičky). *Na štítku injekční lahvičky je uveden objem reagenční vody, který je potřeba přidat. Standard je kalibrován oproti vnitřnímu referenčnímu standardu.*
- Reagenční voda LAL (LRW) (dvě lahvičky)
- **Poznámka:** 20ml voda reagenční třídy (RGW) a LRW ve skleněných injekčních lahvičkách jsou rovnocenné.
- Alkalický roztok pro předběžnou úpravu (dvě injekční lahvičky), který obsahuje *0,125 M KOH a 0,6 M KCl*

Žádné z výše uvedených materiálů, s výjimkou standardu, neobsahují interferující hladiny (1→3)-β-D-glukanu.

- 5. Požadované, ale nedodávané materiály**  
 Žádné materiály nesmějí obsahovat interferující glukan.
- Pipetovací špičky\* (250 μL – kat. č. PPT25, 1 000 μL – kat. č. PPT10)
  - Pipety schopné napipetovat objemy 5–25 μL a 100–1 000 μL
  - Opakovací pipeta se stříkačkovými špičkami vhodná k pipetování 100 μL
  - Testovací zkumavky\* pro přípravku řady standardů (kalibrační křivky) a pro smíchání reagenცი pro přípravu séra. (12 × 75 mm – kat. č. TB240 nebo 13 × 100 mm – kat. č. TB013)
  - Čtečka inkubačních destiček (37 °C) schopná odečítat při 405 nm (pokud možno schopná monitorování dvou vlnových délek při 405 nm a 490 nm) s dynamickým rozsahem minimálně 2,0 jednotky absorbance, ve spojení s vhodným počítačovým softwarem pro kinetické testy.
  - Sterilní zkumavky bez glukanu pro alikvotní vzorky. Lze použít zkumavky, které jsou certifikovány jako neobsahující RNÁzy, DNAázy a pyrogeny.
  - Parafilm®
  - 96jambkové mikrodestičky\* **Poznámka:** Test Fungitell® byl validován s destičkami, které mají následující charakteristiky: polystyrénové, sterilní, nepotahované, s plochým dnem, prosté rušivého beta glukanu (podle specifikace ACC) a jednotlivě balené.

\* Tyto výrobky dodávané společností Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) jsou certifikovány jako výrobky bez interferujících glukanů.

- 6. Uchovávání reagenცი**
- Všechny reagenცი uchovávejte v původním obalu, v temnu a při teplotě 2 °C–8 °C.
  - Rekonstituovanou reagenცი Fungitell® uchovávejte při teplotě 2–8 °C a použijte ji do 2 hodin. Alternativně můžete rekonstituovanou reagenცი Fungitell® zmrazit na teplotu -20 °C na dobu až 20 dnů, jednou rozmrazit a spotřebovat.

- 7. ⚠ Varování a upozornění**
- Nikdy nepipetujte žádné materiály ústy. V prostorách, ve kterých se manipuluje se vzorky nebo s reagenციemi soupravy, nekuřte, nejzte ani nepijte.
  - Dodržujte prováděcí a místní bezpečnostní předpisy.
  - Při manipulaci s biologickými vzorky, které mohou být infekční nebo nebezpečné, používejte ochranné rukavice. Ruce v rukavicích se musí vždy považovat za kontaminované; držte ruce v rukavicích mimo oči, ústa a nos. Pokud existuje možnost kontaminace aerosolem, používejte ochranu očí a chirurgickou masku.
  - **Poznámka:** Soupravy s poškozeným obsahem nepoužívejte.
  - Likvidace: Zbytky chemikálií a přípravků jsou obecně považovány za nebezpečný odpad. Likvidace tohoto druhu odpadu se řídí národními a regionálními zákony a předpisy. Obratě se na místní úřady nebo společnosti zabývající se nakládáním s odpady a požádejte o radu ohledně likvidace nebezpečného odpadu.
  - **Bezpečnostní listy** pro všechny komponenty soupravy Fungitell® si můžete stáhnout z webu společnosti ACC: [www.accusia.com](http://www.accusia.com).

- 7.1 Procedurální opatření**  
 Test Fungitell® vyžaduje, aby byla věnována důkladná pozornost technice a testovacímu prostředí. Důkladné výškolení technika v metodě testu a vyhnout se kontaminaci prostředí jsou kriticky důležité faktory pro účinnost testu.
- Používejte správnou laboratorní praxi v souladu s místními předpisy. Tento test je citlivý na kontaminaci a nepřesnost pipetování.
  - Pro provádění testu zajistěte čisté prostředí.
  - Mějte na paměti, že glukan, stejně jako plísňová kontaminace z lidského těla, oděvu, nádob, vody a vzdušných prachových částic, může interferovat s testem Fungitell®.

- Mezi možné zdroje kontaminace patří: materiály obsahující celulózu, jako je gáza, papírové ubrusky a lepenka, skleněné pipety s vatovými zátkami a pipetovací špičky s celulóзовými filtry. Vysoká množství (1→3)-β-D-glukanu mohou vylučovat také chirurgické gázové bandáže a houby<sup>21,22</sup>. Další zdroje kontaminace související s pacientem naleznete v části Omezení testu.
- Nepoužívejte materiály po datu expirace.

- 7.2 Manipulace se vzorky**
- Odběr krve a příprava séra musí být prováděny v souladu s platnými místními předpisy. Odběr vzorků: Krevní vzorky pro přípravu séra se mohou odebírat do sterilních zkumavek na přípravu séra nebo do zkumavek pro separaci séra (SST).
  - Uchovávaní vzorků: Vzorky séra lze skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu až 15 dnů nebo zmrazené při teplotě -20 °C po dobu až 27 dnů nebo při teplotě -80 °C po dobu až 4 let.
  - Označování vzorků: Vzorky musí být zřetelně označeny v souladu se schválenou praxí zdravotnického zařízení.

- 8. Postup**
- 8.1 Nastavení přístroje a programování testu**  
 Nastavení se u různých přístrojů a softwaru může lišit. Obecně platí následující pravidla: Software čtečky destiček nastavte tak, aby shromažďoval data v režimu průměrné rychlosti. Správná nastavení vyhledejte v příručce k softwaru, aby bylo zajištěno, že vypočtená hodnota se rovná průměrné rychlosti změny optické hustoty pro všechny shromážděné datové body. Interval odečítání detektoru nastavte na minimum povolené softwarem/přístrojem po dobu 40 minut testu. Softwarové nastavení vlnové délky má být 405 nm minus pozadí při 490 nm. Doporučuje se používat obě vlnové délky, ale pokud nemáte k dispozici čtení při dvou vlnových délkách, odečtete test při 405 nm a zkontrolujete kinetickou křivku každého pacientského vzorku, zda nevykazuje známky interference (více podrobnosti uvádí část 9.0). Inkubační teplotu nastavte na 37 °C. Míchání/protřepání destičky nastavte tak, aby nastalo 5–10 sekund před zahájením odečtu. Vyberte nastavení vytváření křivky lineární/lineární nebo ekvivalent. Odečet by měl začít bez prodlevy.

- 8.2 Příprava glukanového standardu dodávaného v soupravě**
- Rozpusťte jednu injekční lahvičku glukanového standardu v objemu LRW uvedeném na injekční lahvičce, aby vznikl roztok o koncentraci 100 pg/ml. Standard rekonstituujte mícháním na třepačce po dobu minimálně 30 sekund při střední až středně vysoké rychlosti (roztok 1). Roztok glukanu je nutno skladovat při teplotě 2 °C–8 °C a použít do 3 dnů. Níže uvedené kroky b - e ukazují příklad postupu vytvoření standardní křivky.
  - Připravte standard o koncentraci 50 pg/ml (roztok 2) smícháním 500 μL LRW a 500 μL roztoku 1 v bezglukanové zkumavce (roztok 2). Promíchejte na třepačce alespoň 10 sekund.
  - Připravte standard o koncentraci 25 pg/ml (roztok 3) smícháním 500 μL LRW a 500 μL roztoku 2 v bezglukanové zkumavce (roztok 3). Promíchejte na třepačce alespoň 10 sekund.
  - Připravte standard o koncentraci 12,5 pg/ml (roztok 4) smícháním 500 μL LRW a 500 μL roztoku 3 v bezglukanové zkumavce (roztok 4). Promíchejte na třepačce alespoň 10 sekund.
  - Připravte standard o koncentraci 6,25 pg/ml (roztok 5) smícháním 500 μL LRW a 500 μL roztoku 4 v bezglukanové zkumavce (roztok 5). Promíchejte na třepačce alespoň 10 sekund.

- 8.3 Otevřete alkalický roztok pro předběžnou úpravu**  
 Alkalický roztok pro předběžnou úpravu přeměňuje glukany uspořádané do trojhrubovíce na jednovláknové glukany<sup>21,22</sup>, které jsou v testu reaktivnější. Alkalické pH navíc slouží k inaktivaci sérových proteáz a inhibitorů, které by mohly s testem interferovat.<sup>24</sup>

Injekční lahvičku zlikvidujte (v souladu s laboratorními postupy), pokud nebude použita v dalším testu. Pokud použita bude, přikryjte ji Parafilmem (použijte tu stranu Parafilmu, která byla zakryta papírovou fólií).

- 8.4 Nastavení mikrotitrační destičky**  
 V softwaru nastavte uspořádání mikrotitrační destičky, kde budou standardy (Std), negativní kontroly (Neg) a 21 vzorků (Spl). Doporučuje se následující uspořádání:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>B</b>		STD1 500	STD1 500		SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	
<b>C</b>		STD2 250	STD2 250		SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	
<b>D</b>		STD3 125	STD3 125		SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	
<b>E</b>		STD4 62,5	STD4 62,5		SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	
<b>F</b>		STD5 31,25	STD5 31,25		SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	
<b>G</b>		Neg.	Neg.		SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	
<b>H</b>												

Do nastavení softwaru zadejte standardní koncentrace, tj. 500, 250, 125, 62,5 a 31 pg/ml.

Povšimněte si, že zadané koncentrace standardů jsou pětkrát vyšší než koncentrace přípravové v části 8.2 výše. To proto, že objem standardu používaný v testu je 25 μL na jamku, což je pětinašobek objemu použitého vzorku séra (viz část 8.5 b. níže). Vzorky séra jsou tedy ve skutečnosti pětkrát zředěnější než standardy. Toto ředění je kompenzováno vynásobením koncentrace standardů číslem pět.

**Poznámka:** Je možné použít vnější jamky, pokud bylo prokázáno, že funkce vnějších jamek je srovnatelná s funkcí vnitřních jamek.

**Poznámka:** Ve standardní křivce se nepoužívají negativní kontroly.

- 8.5 Přidání séra a alkalického roztoku pro předběžnou úpravu**
- Zmrazené vzorky séra nechte rozmrazit při pokojové teplotě. Všechny vzorky dobře promíchejte na třepačce - minimálně 30 sekund při střední až středně vysoké rychlosti.
  - Přenešte 5 μL vzorku séra do každé z určených jamek (UK) minimálně v duplikátech. Opakujte u každého vzorku séra.
  - Do každé jamky obsahující sérum přidejte 20 μL alkalického roztoku pro předběžnou úpravu. Ujistěte se, že kapičky séra a roztoku pro předběžnou úpravu přijdou do vzájemného kontaktu. Poznámka: Kroky b a c je možné provést v obráceném pořádku podle preferenci technika. Poznámka: Aby nedošlo k náhodné kontaminaci, po přidání vzorků a reagenცი do jamek zakryjte mikrodestičku víkem.
  - Destičkou třeste po dobu 5–10 sekund, aby se obsah dobře promíchal (můžete použít funkci třesení destičkou čtečky), poté inkubujte po dobu 10 minut při 37 °C v inkubační čtečce destiček.

- 8.6 Rekonstítuce reagenცი Fungitell®**  
 Poznámka: Tento krok lze snadno provést v době, kdy probíhá inkubace s roztokem pro předběžnou úpravu. Konzistentnost času rekonstítuce zvýší reprodukovatelnost, protože reakce testu Fungitell® začíná po rekonstítuci, i když na nízké úrovni.

Zrekonstitujte jednu injekční lahvičku reagenცი Fungitell® přidáním 2,8 ml LRW a poté přidáním 2,8 ml rekonstitučního pufru Pyrosol pomocí pipety o objemu 1 000 μL. Injekční lahvičku zakryjte Parafilmem tou stranou Parafilmu, která byla zakryta papírovou fólií. Injekční lahvičkou jemně zakružte, aby se obsah zcela rozpustil - nemíchejte na třepačce.

- 8.7 Přidání negativních kontrol a glukanových standardů**  
 Po dokončení inkubace séra s roztokem pro předběžnou úpravu (část 8.5 d.) vyjměte destičku z inkubační čtečky destiček a přidejte na destičku standardy a negativní kontroly. Doporučený vzor koncentrace standardů:
- Přidejte 25 μL LRW do jamek G2 a G3.
  - Přidejte 25 μL standardního roztoku 5 o koncentraci 6,25 pg/ml do jamek F2 a F3 označených 31,25 pg/ml.
  - Přidejte 25 μL standardního roztoku 4 o koncentraci 12,5 pg/ml do jamek E2 a E3 označených 62,5 pg/ml.
  - Přidejte 25 μL standardního roztoku 3 o koncentraci 25 pg/ml do jamek D2 a D3 označených 125 pg/ml.
  - Přidejte 25 μL standardního roztoku 2 o koncentraci 50 pg/ml do jamek C2 a C3 označených 250 pg/ml.
  - Přidejte 25 μL standardního roztoku 1 o koncentraci 100 pg/ml do jamek B2 a B3 označených 500 pg/ml.

- 8.8 Přidání reagenცი Fungitell® a proces inkubace destičky**
- Přidejte 100 μL reagenცი Fungitell® do každé jamky (obsahující negativní kontroly, standardy a vzorky) pomocí krokovací (opakovací) pipety.
  - Vložte destičku do čtečky mikrodestiček (vytemperované na 37 °C), sejměte z ní víko a nechte ji protřepat po dobu 5–10 sekund.

Provádějte odečet destičky **bez víka** při 405 nm minus 490 nm po dobu 40 minut při teplotě 37 °C. Poznámka: Pokud přístroj nedává čas na sejmout víka mezi třepáním a odečtem, třepajte destičkou se sundaným víkem, aby byl odečet proveden bez nasazeného víka.

**9. Výpočet výsledků**  
 Shromážděte data a analyzujte následovně: Zkontrolujte kinetické grafy testovaných vzorků a hledejte vzory odlišující se od hladkého růstu srovnatelné se standardy. Zneplatněte pole indikující optickou interferenci (např. jejich kinetické vzory nesledují vzory standardů). Vypočítejte průměrnou rychlost změny optické hustoty (jednotky miliabsorbance za minutu) u všech bodů mezi 0 a 40 minutami (provádí software). Interpolujte koncentrace (1→3)-β-D-glukanu ve vzorcích ze standardní křivky (provádí software).

- 10. Kontrola kvality**
- Korelační koeficient (r) standardní křivky (lineární vs. lineární) by měl být ≥ 0,980.
  - Jamky s 25 μL LRW jsou negativní kontroly. Výsledky rychlosti negativních kontrol (např. jednotky miliabsorbance za minutu) by měly být nižší než 50 % rychlosti nejnižších standardů. Pokud tomu tak není, test je třeba opakovat s novými reagenციemi.
  - Zacházení s komplexními vzorky. Pokud analytický pracovník zpozoruje v testu vzorku neobvyklou kinetiku, např. vzorek je zakalený, nesprávně zbarvený nebo turbidní (jako vzorky, které jsou silně hemolyzované, lipemické nebo obsahují nadměrné množství bilirubinu), je potřeba vzorek naředit LRW a znovu ho otestovat. Ředění musí být bráno v úvahu při hlášení výsledků - výsledek je nutno znášobit ředícím faktorem. **Typicky se ředící faktor zadává při nastavení softwaru pro vzorek a korekce se aplikuje automaticky.**

**Poznámka:**

- Každý uživatel testu musí zavést program kontroly kvality pro zajištění správného provedení testu v souladu s předpisy platnými pro danou lokalitu.
- Doporučuje se testovat kontrolní vzorky séra (negativní, blízké limitní hodnotě nebo silně pozitivní) v rámci dalších laboratorních kontrol a správné laboratorní praxe. Tyto kontroly nejsou součástí soupravy Fungitell®.

**11. Interpretace výsledků NEGATIVNÍ VÝSLEDEK**  
Hodnoty (1→3)-β-D-glukanu <60 pg/ml jsou interpretovány jako negativní výsledky.

Laboratoř provádějící test musí informovat objedávajícího lékaře, že ne všechny plísněvé infekce způsobí zvýšené hladiny (1→3)-β-D-glukanu v séru. Některé plisně, např. rod *Cryptococcus*<sup>5,6</sup>, produkují velmi nízké hladiny (1→3)-β-D-glukanu. Není známo, že by *Mucorales*, např. *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus*<sup>1,4</sup> produkovaly (1→3)-β-D-glukan. Podobně *Blastomyces dermatitidis* v kvasinkové fázi produkuje málo (1→3)-β-D-glukanu a hladiny (1→3)-β-D-glukanu u pacientů s blastomykózou obvykle nejsou testem Fungitell® detekovatelné<sup>5</sup>.

**NEROZHODNÝ VÝSLEDEK**

Hodnoty od 60 do 79 pg/ml se považují za neprůkazné. Doporučuje se další odběr vzorků a testování séra. Časté odběry vzorků a testování zlepšují použitelnost pro diagnostiku.

**POZITIVNÍ VÝSLEDEK**

Hodnoty (1→3)-β-D-glukanu ≥ 80 pg/ml jsou interpretovány jako pozitivní výsledek. Pozitivní výsledek nedefinuje přítomnost onemocnění a je třeba jej použít spolu s dalšími klinickými nálezy k určení diagnózy.

- Omezení testu**
  - Umístění plísněvé infekce v tkáni<sup>10</sup>, zapouzdření a množství (1→3)-β-D-glukanu produkovaného některými plísněmi mohou ovlivnit sérovou koncentraci tohoto analytu. Snížená schopnost některých plísněvých infekcí zvyšovat hladinu (1→3)-β-D-glukanu v krevním řečišti může snížit schopnost detekce těchto infekcí.
  - Některé osoby mají zvýšené úrovně (1→3)-β-D-glukanu, které spadají do neurčité zóny. V takových případech se doporučuje další sledování a testování.
  - Četnost testování pacientů závisí na relativním riziku plísněvé infekce. U rizikových pacientů se doporučují odběry minimálně dvakrát až třikrát týdně.
  - Pozitivní výsledky byly zjištěny u pacientů na hemodialyze<sup>19,20,39</sup>, subjektů léčených některými frakcionovanými krevními produkty, např. sérovým albuminem a imunoglobuliny<sup>2,25</sup>, a u vzorků nebo subjektů vystavených kontaktu s gázou a chirurgickými houbami obsahujícími glukan. Po chirurgické expozici houbám a gáze obsahujícím (1→3)-β-D-glukan potřebují pacienti 3–4 dny k návratu na výchozí hladiny (1→3)-β-D-glukanu v séru<sup>12,2</sup>. Při odběrech vzorků u pacientů po chirurgickém zákroku je třeba tuto skutečnost brát v úvahu.
  - Vzorky získané metodou odběru z paty nebo prstu nejsou přijatelné, protože se ukázalo, že alkoholem navlžená gáza použita k přípravě místa (a potenciálně hromadění krve na kožním povrchu) kontaminují vzorky. Ve studiích k dnešnímu dni nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi vzorky získanými odběrem ze zavedené kanyly nebo venepunkturou<sup>26,27</sup>.
  - Komplexní posouzení faktorů, které přispívají k falešně pozitivním výsledkům (1→3)-β-D-glukanu, uvádí Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)<sup>9</sup>.
  - Testovací úrovně byly stanoveny u dospělých pacientů. Normální úrovně a úrovně cut-off u kojenců a pediatrických pacientů jsou předmětem zkoumání<sup>18,28</sup>.

**13. Charakteristiky účinnosti**

*13.1 Mezní a očekávané hodnoty*

Multicentrická prospektivní studie<sup>21</sup> provedená s cílem stanovit diagnostickou senzitivitu a diagnostickou specificitu testu Fungitell® (viz srovnávací testování níže) prokázala, že hodnoty beta-glukanu jsou zvýšené při různých plísněvých infekcích. Pokud jsou na úrovni 80 pg/ml nebo vyšší přítomny známka a příznaky, je prediktivní hodnota pacientovy pozitivitu na plísněvou infekci v rozsahu 74,4 % až 91,7 %. Při nepřítomnosti známek a příznaků a hladině nižší než 60 pg/ml je negativní prediktivní hodnota v rozsahu 65,1 % až 85,1 %.

*13.2 Klinická účinnost*

Byla provedena multicentrická prospektivní studie s cílem validovat charakteristiky účinnosti testu Fungitell<sup>21</sup>. Test byl porovnáván s jinými standardními metodami detekce (tj. krevní kultivace, histopatologické vyšetření bioptického vzorku a radiologické známky) mykóz a fungemií.

Test byl použit k testování tři sta padesáti devíti (359) subjektů. Od každého subjektu byl získán jeden vzorek. Mezi subjekty klinických pracovišť s nízkým rizikem patřili zjevně zdraví jedinci a osoby, které byly do nemocnice přijaty z jiných důvodů než kvůli plísněvé infekci. Nábor pacientů byl prováděn na šesti klinických pracovištích ve Spojených státech. Čtyři z těchto klinických pracovišť prováděla test a testovala celkem 285 vzorků. Associates of Cape Cod, Inc., (ACC) testovala všech 359 vzorků dvakrát, avšak ke stanovení účinnosti testu použila pouze druhý set výsledků. Výsledky druhého setu analýz se statisticky nelišily od prvního setu.

• **Diagnostická senzitivita**

Senzitivita pro celou populaci subjektů (359) včetně pacientů s kryptokokózou byla 65,0 % ([95% interval spolehlivosti (CI) 60,1–70,0 %) (tabulka 1).

• **Diagnostická specifita**

Specifita byla 81,1 % (CI 77,1–85,2 %). Při analýze 170 subjektů negativních na plísněvou infekci a zjevně zdravých jedinců byla specifita testu 86,5 % (CI 82,–89,1 %). Po zahrnutí dalších 26 subjektů, kteří byli negativní na plísněvou infekci, ale měli jiné onemocnění, byla pozorována specifita 81,1 % (CI 77,1–85,2 %).

<b>Tabulka 1 Výsledek testu ACC při mezní hladině 60–80 pg/ml podle pracovišť*</b>								
Pracoviště	Prokázaná/právděpodobná senzitivita ≥ 80 pg/ml			Specifita < 60 pg/ml				Celkem
	Poz./Klin. Poz.	Senzitivita	Pozitivní Prediktivní Hodnota	Neg./Klin. Neg.	Specifita	Negativní Prediktivní Hodnota	Nejednoznané 60 <= X < 80	
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	Neuplatňuje se	0/0	Neuplatňuje se	0,0	0	1
Celkem	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Když byly výsledky získané společností ACC (359 vzorků) a klinickými pracovišti (285 vzorků) porovnány s klinickou diagnózou, senzitivita byla 64,3 % (CI 58,8–69,9 %) pro ACC a 61,5 % (CI 55,9–67,2 %) pro klinická pracoviště. Specifita je 86,6 % (CI 82,7–90,6 %) pro ACC versus 79,6 % (CI 74,9–84,3 %) pro klinická pracoviště.

**Kandidóza**

Prospektivní studie se účastnilo 107 subjektů, kterým byla pozitivně diagnostikována kandidóza. Z těchto 107 subjektů jich 83 bylo pozitivních testem Fungitell®.

Sto sedmdesát pět vzorků kandidózy z knihovny bylo poskytnuto společnosti Associates of Cape Cod, Inc. 145 ze 175 vzorků bylo v testu pozitivních.

**Aspergilóza**

Celkem 10 subjektů bylo pozitivních na aspergilózu. U 8 z těchto 10 subjektů byl test pozitivní.

**Fuzarióza**

Tři subjekty byly pozitivní na fuzariózu. U 2 z těchto 3 subjektů byl test pozitivní.

**Protiplísňová léčková terapie**

Přítomnost nebo nepřítomnost protiplísňové léčkové terapie nemá žádný statisticky významný vliv na senzitivitu testu. 118 subjektů bylo prokazatelně pozitivních na invazivní plísněvou infekci a podstupovalo protiplísňovou terapii. U 82 byl test pozitivní (senzitivita 69,5 %; CI 61,2–77,8 %), K tomu bylo dvacet čtyři (24) subjektů prokazatelně pozitivních, ale nepodstupovalo protiplísňovou terapii. U 18 byl test pozitivní (senzitivita 75 %; CI 57,7–92,3 %).

*13.3 Korelace testu*

Čtyři klinická pracoviště testovala celkem 285 vzorků. Výsledky testů pracovišť korelovaly kvantitativně na 96,4 % s výsledky společnosti Associates of Cape Cod, Inc. Korelace Associates of Cape Cod, Inc., s jednotlivými testovacími pracovišti byla v rozsahu 90,6 až 99,2 %.

*13.4 Preciznost*

Preciznost testu Fungitell® (tj. opakovatelnost a reprodukovatelnost) byla hodnocena pomocí deseti (10) různých vzorků, které byly testovány třemi testovacími pracovišti ve tři různé dny. Variace v rámci testy se pohybovala od 0,9 do 28,9 % a sloužila jako měřítko opakovatelnosti. Hodnoty mezi testy se pohybovaly od 3,9 do 23,8 % a sloužily jako měřítko reprodukovatelnosti. Z obou analýz byly vyloučeny čtyři (4) negativní vzorky.

*13.5 Rozsah měření a linearita*

Výsledky jsou vyjádřeny v pg/ml séra v rozsahu od nedetekovatelných (<31 pg/ml) po >500 pg/ml a jsou vytištěny softwarem nebo odečteny ze standardní křivky. Pro dosažení přesných hodnot při koncentracích nad 500 pg/ml je potřeba naředit vzorek reagenční vodou LAL a test zopakovat. Jak je uvedeno v části Kontrola kvality, korelační koeficient (r) standardní křivky (lineární vs. lineární) pokrývající měřicí rozsah testu Fungitell® byl měl být ≥ 0,980 a negativní kontroly by měly mít hodnoty rychlosti (např. jednotky milisebance za minutu) menší než 50 % rychlosti nejnižšího standardu. Pokud tomu tak není, test je třeba opakovat s novými reagenciemi.

*13.6 Interferující látky*














- Niže uvedené stavy vzorků mohou interferovat s přesností výsledků testu Fungitell®:
- Zabarvené nebo zakalené vzorky, např. vysoce hemolyzované, lipemické nebo obsahující příliš velké množství bilirubinu, mohou opticky interferovat s testem. Při testování takových vzorků je třeba výsledek testu zkontrolovat z hlediska optické interference a/nebo neobvyklých kinetických vzorů.

- Zvýšené hladiny imunoglobulinu G, které mohou být v séru v důsledku mnohočetného myelomu, mohou po přidání reagenční Fungitell® k předem upravenému séru způsobovat precipitaci v reakční směsi<sup>39</sup>.
- V době psaní tohoto textu nebyl popsán žádný jiný aktivční faktor G (detekční prvek (1→3)-β-glukanu) reaguecie Fungitell® než (1→3)-β-glukan. V některých studiích, které tvrdily, že dochází ke zkrácení reaktivité, byl signál eliminován ošetřením údajného aktivčního materiálu purifikovanou (1→3)-β-glukanázou, což prokazuje, že pozorovaná aktivace byla způsobena kontaminujícím (1→3)-β-glukanem<sup>5</sup>. Kontaminace serinovými proteázami může také vést k uvolnění para-nitroanilinu v reakčních směsích testu Fungitell®, ale ty jsou inaktivovány v rámci předběžné úpravy.

**14. Metaanalýzy**

Dále bylo publikováno mnoho recenzovaných studií na téma (1→3)-β-D-glukanu v séru jako podpora při diagnostice invazivního plísněového onemocnění, včetně metaanalýz diagnostické výkonnosti<sup>12,34,35,36,37</sup>.

**15. Legenda značek**

	„Použit do data“		„Čtete návod k použití“
	„Obsahuje dostatečné množství pro „N“ testů“		„Zplnomocněný zástupce“
	„Kód dávky“		„Označení CE“
	„Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro“		„Pouze na předpis“
	„Katalogové číslo“		„Pozor“
	„Omezení teploty“		„Nevystavujte slunečnímu záření“
	„Výrobce“		

**16. Zplnomocněný zástupce**

 Emergo Europe
Prinsessegracht 20, 2514 AP, The Hague, Nizozemsko

Australský zadavatel: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Austrálie

**Poznámka:** Závažné události, ke kterým došlo v souvislosti s tímto prostředkem, je nutné ohlásit výroci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém se uživatel a/nebo pacient nachází.

**17. Kontaktní informace**

**Sídlo společnosti**

**Associates of Cape Cod, Inc.**

124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536-4445 USA

Tel.: (888) 395-2221 nebo (508) 540-3444 • Fax: +1 (508) 540-8680

E-mail: custservice@acciusa.com • www.acciusa.com

**Spojené království**

**Associates of Cape Cod Int’l, Inc.**

Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Spojené království

Tel.: (44) 151–547–7444 • Fax: (44) 151–547–7400

E-mail: info@acciuk.co.uk • www.acciuk.co.uk

**Evropa**

**Associates of Cape Cod Europe GmbH**

Offstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Německo

Tel.: (49) 61 05–96 10 0

**18. Historie revizi**

**Rev 0 až 11:** Testování v triplikátech bylo změněno na testování v duplikátech. Voda reagenční třídy byla změněna na reagenční vodu LAL. Komponenty KCl a KOH byly složené do alkalického roztoku pro předběžnou úpravu. Ze soupravy byla odstráněna mikrodestička, která je nabízena jako požadovaná položka, jež není součástí dodávky. Zástupce v ES byl změněn a byl přidán australský zadavatel. Drobná vysvětlení, formátování, přidání symbolů, další interferující látky.

**19. Odkazy**

- 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.
- Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K-1., 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.
- Binder, U., Maurer, E., and Lass-Flörl, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Lin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl.6): 60-66.
- 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.
- Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999: 1:247-261.
- Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New 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 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-Flörl, 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.

- Livintsev, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grurich, D.E., Kerkerung, 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.

- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Sacki, 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.

- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemophylm clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.
- Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (1→3)-β-D-Gluacans. Carbohydrate Res. 218:167-174.

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

- 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 (In Physiol.) 113:683-686.

- 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.

- 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.

- Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Amedu, 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 gauge types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.

- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, 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.

- 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.
- Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T. and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-β-D-Glucan in human blood. Clin. Chim. Acta 226: 109-112.

- 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.

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

- Posteraro, B., De Pascale, G., Tambarello, 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.

- 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.

- Goudjil, S., Kongolo, G., Dusol, L., Imestouren, 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.

- 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.

- Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Sacki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)-β-D-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin. Inf. Dis. 41: 299-305.
- Karaeorgopoulos 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.

- 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 Infections: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. PLoS One. 2015 Jul 6;10:e01631602.

- 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 (ECLIL-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633-43.

- Onishi A1, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa T, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012; 50