

Test na (1→3)-β-D-glukán v sére

TEST FUNGITELL®

Návod na použitie



ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED


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

Telefón: (508) 540-3444
 Bezplatne: (888) 395-2221
 Fax: (508) 540-8680
 Technická podpora: (800) 848-3248
 Zákaznícky servis: (800) 525-8378

42



PN001268-sk Rev12
 FT001
2023-06-13

 Návod na použitie vo svojom jazyku nájdete na stránke www.acciusa.com.

Tento produkt je určený len na diagnostické použitie in vitro a profesionálne použitie.

1. Určené použitie

Test Fungitell® je kolorimetrický test na báze zymogénu proteázy na kvalitatívnu detekciu (1→3)-β-D-glukánu v sére pacientov s príznakmi alebo ochoreniami, v dôsledku ktorých má pacient predispozíciu na invazívnu plesňovú infekciu. Sérová koncentrácia (1→3)-β-D-glukánu – hlavnej zložky bunkovej steny rôznych medicínsky významných plesní – sa dá využiť ako pomôcka pri diagnostike hlbokých mykóz a fungémií. Kladný výsledok neurčuje, ktorý rod plesní mohol infekciu vyvolať.

Je potrebné použiť titre (1→3)-β-D-glukánu v spojitosti s inými diagnostickými postupmi, napríklad mikrobiologickou kultiváciou, histologickým vyšetrením vzoriek z biopsie a rádiologickým vyšetrením.

Dôležité upozornenie

Lekárovi, ktorý si vyžiadal test, poskytnite tieto informácie: *Niektoré plesne, ako napríklad rod Cryptococcus, ktoré produkujú veľmi malé množstvá (1→3)-β-D-glukánu, nemajú spôsobovať zvýšenie sérového (1→3)-β-D-glukánu v miere postačujúcej na detekciu pomocou testu^{1, 2}. V prípade infekcií plesňami radu Mucorales, ako napríklad Absidia, Mucor a Rhizopus^{1, 4}, o ktorých je známe, že neprodukujú (1→3)-β-D-glukán, sa tiež pozorovali nízke titre sérového (1→3)-β-D-glukánu. Aj kvasinková fáza blastomycetickéj dermatitídy produkuje malé množstvá (1→3)-β-D-glukánu a test ju nemusí zachytiť⁶.*

Toto vyhlásenie pripojte k hláseniu výsledkov testu Fungitell®.

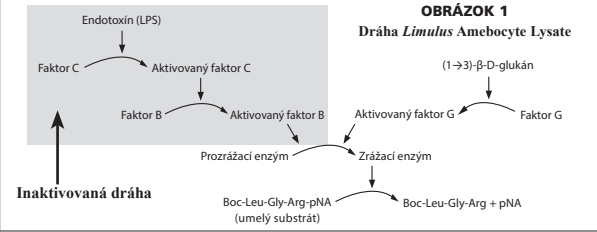
2. Zhrnutie a vysvetlenie

Je preukázané súvňajúci výskyt plesňových infekcií spôsobených oportunistickými patogénmi, a to najmä u pacientov s oslabenou imunitou^{3, 5}. Invazívne plesňové ochorenia, ako napríklad oportunistické infekcie, sú bežné u pacientov s hematologickými malignitami a u pacientov s AIDS, a zodpovedajú za čoraz väčší počet nozokomiálnych infekcií, a to najmä u príjemcov po transplantácii orgánov a u iných pacientov liečených imunosupresívnou liečbou¹⁰. Mnohé plesňové ochorenia možno získať vdychovaním spór plesní z pôdy, organických zvyškov rastlín, klimatizačných systémov alebo exponovaných povrchov. Niektoré oportunistické plesne sú prítomné v ľudskej koži alebo na nej, v zažívacom trakte a na slizniciach^{11,12}. Diagnostika invazívnych mykóz a fungémií obvykle vychádza z nešpecifickej diagnózy alebo rádiologických techník. K dostupným diagnostickým metódam sa nedávno zaradili aj biologické markery plesňovej infekcie².

K oportunistickým plesňovým patogénom patria *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* a *Pneumocystis jirovecii*. (1→3)-β-D-glukán, ktorý produkujú tieto organizmy a iné, možno detegovať pomocou testu Fungitell® ^{1, 8, 13, 14}.

3. Princíp postupu

Testom Fungitell® sa meria (1→3)-β-D-glukán. Test je založený na modifikácii dráhy metodiky LAL (lyzáť amebocytov kraba *Limulus*)^{15,16,17,18}. Obrázok 1. Reagencia v teste Fungitell® je modifikovaná tak, aby eliminovala reaktivitu bakteriálneho endotoxínu, čiže aby reagovala len na (1→3)-β-D-glukán prostredníctvom strany dráhy sprostredkovanej faktorom G. (1→3)-β-D-glukán aktivuje faktor G, zymogén serinovej proteázy. Aktivovaný faktor G mení neaktívny prozrážaci enzým na aktívny zrážaci enzým, ktorý zas štípe para-nitroanilid (pNA) z chromogénneho peptidového substrátu, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, čím vzniká chromofór – para-nitroanilín, ktorý sa absorbuje pri vlnovej dĺžke 405 nm. To opísaný kinetický test Fungitell® je založený na stanovení zvýšenia miery optickej hustoty vyprodukovaného vzorkou. Táto miera sa interpretuje podľa krivky štandardu, na základe ktorej sa odhaduje koncentrácia (1→3)-β-D-glukánu vo vzorke.



4. Materiály priložené v súprave Fungitell®
 Súprava Fungitell® je určená na diagnostické použitie in vitro. Nasledujúce materiály priložené ku každej súprave postačujú na testovanie 110 jamiek na dvoch mikrotitrových platničkách (55 jamiek na každej):

- Reagencia Fungitell®, lyofilizovaný LAL špecifický pre (1→3)-β-D-glukán (dve liekovky). *Reagencia Fungitell® sa skladá z lyzáť amebocytov kraba Limulus (t. j. kraba podkovára, a Boc-Leu-Gly-Arg-pNA kolorimetrického substrátu. Neobsahuje ľudské ani cicavce proteíny.*
- Rekonštitučný pufo Pyrosol® (dve liekovky). Ďalšie liekovky s rekonštitučným pufrom Pyrosol (katalógové číslo BC051) možno zakúpiť samostatne. *Pozostáva z 0,2 M tris pufru.*
- Glukánový štandard, lyofilizovaný (1→3)-β-D-glukán od spoločnosti Pachyman (dve liekovky). *Objem vody reagenčnej kvality, ktorý sa má pridať, je uvedený na štítku liekovky. Kalibruje sa podľa interného referenčného štandardu.*
- Voda LAL reagenčnej kvality (LRW) (dve fľaše) **Poznámka:** 20 ml vody reagenčnej kvality (RGW) a LRW v sklenených fľašiach sú rovnocenné.
- Alkalický roztok na predúpravu (dve fľaše), ktorý obsahuje *0,125 M KOH a 0,6 M KCl*

Všetky uvedené materiály, s výnimkou štandardu, nemajú interferujúce hladiny (1→3)-β-D-glukánu.

5. Potrebné, ale nepriložené materiály

Žiadny materiál nesmie mať interferujúci glukán.

- Pipetové špičky* (250 µl – kat. č. PPT25, 1 000 µl – kat. č. PPT10)
- Pipety na dávkovanie objemov 5 – 25 µl a 100 – 1 000 µl
- Skúmavica pipeta so striekačkovými špičkami na dávkovanie objemu 100 µl
- Škúmavky* na prípravu sérií štandardu (kalibračné krivky) a na zmiešanie reagensii na prípravu séra (12 x 75 mm – kat. č. TB240 alebo 13 x 100 mm – kat. č. TB013).
- Inkubačná (37 °C) čítačka platničky schopná merania pri vlnovej dĺžke 405 nm (optimálne schopná monitorovania pri dvoch vlnových dĺžkach 405 a 490 nm) s dynamickým rozsahom min. do 2,0 absorbančných jednotiek, spojená s vhodným počítačovým softvérom na kinetické analýzy.
- Sterilné skúmavky bez glukánu na alikvótne podávanie vzoriek. Môžu sa používať skúmavky, ktoré sú certifikované ako neobsahujúce RNase, DNase a pyrogén.
- Parafil™
- Poznámka k mikroplatničke s 96 jamkami*: Test Fungitell® boli validovaný s platničkami, ktoré majú nasledujúce vlastnosti: polystyrénové, sterilné, nepotiahnuté, s plochým dnom, žiaden interferujúci beta glukán podľa špecifikácií spoločnosti ACC a jednotlivio balené.

* Tieto výrobky dodávané spoločnosťou Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) sú certifikované ako produkty bez interferujúcich glukánov.

6. Uchovávanie reagensii

- Všetky dodané reagensie uchovávajte v tme pri teplote 2 – 8 °C.
- Rekonštituovaná reagencia Fungitell® sa musí uchovávať pri teplote 2 – 8 °C a spotrebovať do 2 hodín. Rekonštituovanú reagensiu Fungitell® možno pripadne zmraziť pri teplote -20 °C na dobu maximálne 20 dní, raz rozmraziť a použiť.

7. ⚠️ Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Žiadny materiál nepipetujte ústami. V miestnosti, kde sa manipuluje so vzorkami alebo reagensiami súpravy nefajčíte, nejedzte a nepite.
- Dodržiavajte prevádzkové a miestne bezpečnostné predpisy.
- Pri manipulácii s biologickými vzorkami, ktoré môžu byť infekčné alebo nebezpečné, používajte ochranné rukavice. Ruky v rukaviciach by sa mali vždy považovať za kontaminované. Ruky v rukaviciach držte ďalej od očí, úst a nosa. Ak existuje možnosť kontaminácie aerosólom, noste chránič očí a chirurgickú masku.
- Poznámka:** Nepoužívajte súpravy s poškodeným obsahom.
- Likvidácia: Zvyšky chemických látok a prípravkov sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Likvidácia tohto druhu odpadu sa riadi vnútroštátnymi a regionálnymi právnymi predpismi a nariadeniami. Ohľadom likvidácie nebezpečného odpadu sa obráťte na miestne úrady alebo spoločnosti zaoberajúce sa nakladaním s odpadom.
- Karty bezpečnostných údajov** pre všetky komponenty súpravy Fungitell® si môžete stiahnuť z webovej stránky ACC: www.acciusa.com.

7.1 Procedurálne opatrenia

- Test Fungitell® si vyžaduje dôslednú pozornosť venovanú technike a prostrediu testovania. Pre účinnosť testu je mimoriadne dôležité dôkladné zaškolenie technika v oblasti metodiky testu a zamedzenie kontaminácie.
- Používajte správnu laboratórnu prax podľa miestnych predpisov. Tento test je citlivý na kontamináciu a nepresnosť pipetovania.
- Na vykonanie testu pripravte čisté prostredie.

- Upozorňujeme, že glukán aj kontaminácia plesňovými časticami z ľudskeho tela, odevu, nádob, vody a prachu vo vzduchu môžu ovplyvniť výsledky testu Fungitell®.
- Možné zdroje kontaminácie: materiály obsahujúce celulózu, ako sú gáza, papierové utierky a kartón, sklenené pipety s bavlnenou zátkou a špičky pipiet s celulóзовými filtrami. Chirurgické gázy a spongie môžu tiež vylučovať veľké množstvo (1→3)-β-D-glukánu^{21, 22}. Ďalšie zdroje kontaminácie súvisiace s pacientom nájdete v časti Obmedzenia testu.
- Nepoužívajte materiály po dátume expirácie.

7.2 Manipulácia so vzorkami

- Odber krvi a príprava séra sa vykonáva v súlade s platnými miestnymi predpismi. Odber vzorky: Vzorky krvi možno odobrať do sterilných skúmaviek na prípravu séra alebo do skúmaviek na separáciu séra (SST) na účely prípravy séra.
- Uchovávanie vzoriek: Vzorky séra sa môžu skladovať pri teplote 2 – 8 °C až 15 dní alebo zmrazené pri teplote –20 °C až 27 dní alebo pri teplote –80 °C až 4 roky.
- Označenie vzoriek: Vzorky sa musia jasne označiť v súlade s postupmi schválenými v danej inštitúcii.

8. Postup

8.1 Nastavenie prístroja a programovanie testov

Nastavenia v rôznych prístrojoch a softvéroch sa môžu líšiť. Vo všeobecnosti platia tieto zásady: Softvér čítačky platničky nastavte tak, aby zhromažďoval údaje v režime Vmean. Správne nastavenie si pozrite v príručke k softvéru, aby bolo zaručené, že vypočítaná hodnota je stredná miera zmeny optickej hustoty pre všetky získané body údajov. Interval čítania detektora počas 40 minút trvania testu nastavte na minimum umožnené softvérom/prístrojom. V softvéri nastavte vlnovú dĺžku 405 nm minus pozadie pri 490 nm. Odporúča sa použiť obe vlnové dĺžky, ale ak nie je k dispozícii odčítanie dvoch vlnových dĺžok, odčítajte test pri 405 nm a preskúmajte kinetickú krivku každej vzorky pacienta, či sa v nej nevyskytujú známky interferencie (ďalšie podrobnosti nájdete v časti 9.0). Inkubačnú teplotu nastavte na 37 °C. Miešanie/potrásenie platničky nastavte tak, aby prebehlo po dobu 5 – 10 sekúnd pred začatím merania. Prísposobenie krivke nastavte na „lineárne/lineárne“ alebo na ekvivalentnú voľbu. Meranie sa musí začať bez akéhokoľvek oneskorenia.

8.2 Príprava glukánového štandardu dodaného v súprave.

- Jednu liekovku glukánového štandardu rozpustíte v objeme vody LRW uvedenom na liekovke tak, aby vznikol roztok 100 pg/ml. Minimálne 30 sekúnd miešajte vo vortexovom miešadle na stredne vysokej rýchlosti, aby sa štandard rekonšituoval (roztok 1). Glukánový roztok sa musí uchovávať pri teplote 2 – 8 °C a spotrebovať do troch dní. V nasledujúcich krokoch b – e je uvedený príklad postupu prípravy krivky štandardu.
- Pripravte štandard 50 pg/ml (roztok 2) zmiešaním 500 µl vody LRW a 500 µl roztoku 1 v skúmavke bez obsahu glukánu (roztok 2). Minimálne 10 sekúnd miešajte vortexovým miešadlom.
- Pripravte štandard 25 pg/ml (roztok 3) zmiešaním 500 µl vody LRW a 500 µl roztoku 2 v skúmavke bez obsahu glukánu (roztok 3). Minimálne 10 sekúnd miešajte vortexovým miešadlom.
- Pripravte štandard 12,5 pg/ml (roztok 4) zmiešaním 500 µl vody LRW a 500 µl roztoku 3 v skúmavke bez obsahu glukánu (roztok 4). Minimálne 10 sekúnd miešajte vortexovým miešadlom.
- Pripravte štandard 6,25 pg/ml (roztok 5) zmiešaním 500 µl vody LRW a 500 µl roztoku 4 v skúmavke bez obsahu glukánu (roztok 5). Minimálne 10 sekúnd miešajte vortexovým miešadlom.

8.3 Otvorte alkalický predprípravný roztok.

Zásadité predprípravný roztok konvertuje trojzvitnicové glukány na jednovláknové glukány^{17, 18}, ktoré sú reaktívnejšie pri použití testu. Okrem toho zásadité pH slúži na inaktíváciu sérových proteáz a inhibitorov, ktoré môžu interferovať s testom.²⁴

Liekovku zlikvidujte (v súlade s laboratórnymi postupmi), pokiaľ ju nebudete používať v nasledujúcom meraní. V takom prípade ju zakryte fóliou Parafil™ pomocou tej strany fólie, ktorá smerovala k papierovému podkladu.

8.4 Nastavenie mikrotitračnej platničky

V softvéri nastavte usporiadanie mikrotitrovej platničky so štandardmi (Std), negatívnymi kontrolami (Neg) a 21 vzorkami (Spl). Odporúča sa nasledujúce rozloženie:

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

Do nastavení softvéru zadajte koncentrácie štandardu ako 500, 250, 125, 62,5 a 31 pg/ml v príslušnom poradí.

Upozorňujeme, že zadané koncentrácie štandardu sú päťkrát vyššie ako koncentrácie pripravene v časti 8.2 vyššie. Je to preto, lebo v teste sa používa objem štandardu 25 µl na jamku, čo je päťkrát viac ako objem použitej vzorky séra (pozrite si časť 8.5 b. nižšie). Vzorka séra sa teda účinne zriedi päťnásobne v porovnaní so štandardom. Násobenie štandardných koncentrácií piatimi kompenzuje toto zriedenie.

Poznámka: Vonkajšie jamky možno použiť, ak sa preukáže, že výkon vonkajších jamiek je porovnateľný s výkonom vnútorných jamiek.

Poznámka: Negatívne kontroly sa v krivke štandardu nepoužívajú.

8.5 Prídanie séra a alkalického roztoku na predúpravu.

- Vzorky so zmrazeným sérom rozmrzte pri izbovej teplote. Všetky vzorky tiež miešajte vortexovým miešadlom najmenej 30 sekúnd na strednej až stredne vysokej rýchlosti.
- Do každej určenej jamky (Uk) prinajmenšom duplicitne prenete 5 µl vzorky séra. Zopakujte sa každou vzorkou séra.
- Do každej jamky obsahujúcej sérum pridajte 20 µl alkalického predprípravného roztoku. Ubezpečte sa, že sérum a kvapky predprípravej reagensie sa dostanú do vzájomného kontaktu. Poznámka: Kroky b a c možno vykonať v opačnom poradí podľa preferencií technika. Poznámka: S cieľom zamedziť prípadnej kontaminácii po pridaní vzoriek a reagensii do jamiek mikroplatničky zakryte.
- Platničkou traste 5 – 10 sekúnd, aby sa premiešal obsah jamiek (možno použiť funkciu čítačky umožňujúcu trasenie platničkou), potom inkubujte 10 minút pri teplote 37 °C v inkubačnej čítačke platničiek.

8.6 Rekonštitúcia reagensie Fungitell®.

Poznámka: Tento krok možno prakticky pripraviť, kým prebieha predprípravná inkubácia. Jednotné načasovanie rekonštitúcie zlepší opakovateľnosť, pretože reakcia v teste Fungitell® sa začína už pri rekonštitúcii, i keď na malej úrovni.

Rekonštituujte jednu liekovku reagensie Fungitell® pridaním 2,8 ml vody LRW a následným pridaním 2,8 ml rekonštitučného pufru Pyrosol pomocou 1 000 µl pipety. Liekovku prikryte tou stranou fólie Parafil™, ktorá smerovala k papierovému podkladu. Liekovku jemne rozvrtite, aby sa obsah úplne rozpustil – nemiešajte vortexovým miešadlom.

8.7 Prídanie negatívnych kontrol a glukánových štandardov.

Na konci inkubácie na účely predprípravy séra (časť 8.5 d) vyberte platničku z inkubačnej čítačky platničky a do platničky pridajte štandardy a negatívne kontroly. Odporúčaný vzor koncentrácie štandardu:

- Do jamiek G2 a G3 pridajte 25 µl vody LRW.
- Do jamiek F2 a F3 označených ako 31,25 pg/ml pridajte 25 µl zo 6,25 pg/ml roztoku štandardu 5.
- Do jamiek E2 a E3 označených ako 62,5 pg/ml pridajte 25 µl z 12,5 pg/ml roztoku štandardu 4.
- Do jamiek D2 a D3 označených ako 125 pg/ml pridajte 25 µl z 25 pg/ml roztoku štandardu 3.
- Do jamiek C2 a C3 označených ako 250 pg/ml pridajte 25 µl z 50 pg/ml roztoku štandardu 2.
- Do jamiek B2 a B3 označených ako 500 pg/ml pridajte 25 µl zo 100 pg/ml roztoku štandardu 1.

8.8 Postup prídania reagensie Fungitell® a inkubácie platničky.

- Do každej jamky (obsahujúcej negatívne kontroly, štandardy a vzorky) pridajte 100 µl reagensie Fungitell® pomocou krokovacej (opakovacej) pipety.
- Platničku vložte do čítačky mikroplatničky (ekvilibrovanej na teplotu 37 °C), zložte veko a traste 5 – 10 sekúnd.

Odčítajte platničku **bez veka** pri 405 nm mínus 490 nm 40 minút pri 37 °C. Poznámka: Ak prístroj medzi trasením a odčítaním neumozňuje zložiť veko, na zabezpečenie odčítania bez veka traste bez veka.

9. Výpočet výsledkov.

Zhromaždíte údaje a analyzujete ich nasledujúcim spôsobom: Preskúmajte grafy kinetiky testovacích vzoriek a hľadajte vzorec, ktorý sa líši od plynlého stúpania porovnateľného so stúpaním v prípade štandardov. Grafy signalizujúce optickú interferenciu (napr. ich kinetický vzorec nezodpovedá štandardom) označte za neplatné. Vypočítajte strednú mieru zmeny optickej hustoty (jednotky miliasorbancie za minútu) pre všetky body v rozptáli od 0 do 40 minút (vykoná softvér). Interpolujte vzorkové koncentrácie (1→3)-β-D-glukánu z krivky štandardu (vykoná softvér).

10. Kontrola kvality

- Korelačný koeficient (r) krivky štandardu (lineárne verzus lineárne) má byť ≥ 0,980.
- Jamky s 25 µl vody LRW sú negatívne kontroly. Negatívne kontroly majú mať výsledky rýchlosti (napr. jednotky miliasorbancie za minútu) nižšiu ako 50 % najnižšej štandardnej rýchlosti. V opačnom prípade sa test musí zopakovať s novými reagensiami.
- Spracovanie zložitých vzoriek. Ak analytik spozoruje neobvyklú kinetiku pri testovaní vzorky, napr. vzorky, ktorá je mútna, vyblednutá alebo zakaľená (napríklad výrazne hemolyzované, lipemické vzorky alebo vzorky obsahujúce nadmerné množstvá bilirubínu), vzorka sa musí nariadení vodou LRW a test sa musí zopakovať. V správe o výsledkoch sa toto riešenie musí zohľadniť vynásobením výsledku koeficientom zriedenia. **Koeficient zriedenia sa obvykle zadáva v nastavení softvéru pre konkrétnu vzorku a korekcia sa aplikuje automaticky.**

Poznámka:

- Každý používateľ testu si má vypracovať program kontroly kvality s cieľom zaistiť spôsobilosť výkonu testu v súlade s predpismi platnými na danom mieste.
- V rámci ďalších laboratorných kontrol a správnej laboratórnej praxe sa odporúča testovať kontrolné vzorky séra (záporné, blízko hraničnej hodnoty alebo silne kladné. Tieto nie sú súčasťou súpravy Fungitell®.

11. Interpretácia výsledkov NEGATÍVNY VÝSLEDOK

Hodnoty (1→3)-β-D-glukánu na úrovni <60 pg/ml sa interpretujú ako negatívne výsledky.

Laboratórium vykonávajúce test musí informovať objednávajúceho lekára, že nie všetky plesňové infekcie vedú k zvýšeným hladinám (1→3)-β-D-glukánu v sére. Niektoré plesne, napríklad rod *Cryptococcus*, 4, produkujú veľmi malé množstvá (1→3)-β-D-glukánu. Je známe, že *Mucorales*, ako napríklad *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus*,¹⁴ neprodukujú (1→3)-β-D-glukán. Podobne aj *blastomycetická dermatitída* vo svojej kvasinikovej forme produkuje nízke množstvá (1→3)-β-D-glukánu, takže pacienti s blastomykózou obvykle majú nedetegovateľné množstvo (1→3)-β-D-glukánu pri testovaní pomocou testu Fungitell®.

NEURČITÝ VÝSLEDOK

Hodnoty od 60 do 79 pg/ml sa považujú za nepresvedčivé. Odporúča sa odobratie ďalšej vzorky séra a testovanie. Časté odobranie a testovanie vzoriek zlepšuje využiteľnosť na účely stanovenia diagnózy.

POZITÍVNY VÝSLEDOK

Hodnoty (1→3)-β-D-glukánu ≥ 80 pg/mL sa interpretujú ako pozitívny výsledok. Kladný výsledok ešte nestanovuje prítomnosť choroby a musí sa použiť spolu s ďalšími klinickými náleznmi s cieľom stanoviť diagnózu.

12. Obmedzenia testa

- Tkanivo, kde je lokalizovaná plesňová infekcia¹⁰, zapuzdrenie a množstvo (1→3)-β-D-glukánu produkovaného konkrétnymi plesňami môžu ovplyvniť koncentráciu tohto analytu v sére. Znížená schopnosť priňašať (1→3)-β-D-glukán do krvného riečiska môže znížiť schopnosť detegovať niektoré plesňové infekcie.
- Niektorí jedinci majú zvýšené hladiny (1→3)-β-D-glukánu, ktoré patria do neurčitéj zóny. V takom prípade sa odporúča ďalšie pozorovacie testovanie.
- Frekvencia testovania pacienta bude závisieť od relatívneho rizika plesňovej infekcie.
- U rizikových pacientov sa odporúča interval odberu vzoriek najmenej dva- až trikrát týždenne.
- Pozitívne výsledky sa zistili u hemodialyzovaných pacientov^{28,30} pacientov liečených niektorými produktmi z frakcionovanej krvi, napríklad sérovým albumínom a imunoglobulínm^{23, 29}, a vo vzorkách alebo u pacientov s kontaktom s gazou a chirurgickými špongiami s obsahom glukánu. Pacient potrebuje 3 – 4 dni na obnovenie východiskovej hladiny séroveho (1→3)-β-D-glukánu po chirurgickej expozícii špongiám a gázam obsahujúcim (1→3)-β-D-glukán^{21,22}. Pri plánovaní odberu vzoriek u chirurgických pacientov to treba zohľadniť.
- Vzorky získané odberom z päty alebo prsta sú nepriateľné, pretože sa preukázalo, že alkoholom napustená gáza, ktorá sa používa na prípravu miesta (a potenciálne aj nahromadenie krvi k povrchu kože), kontaminujú vzorky. V doterajších štúdiách sa nepozorovali žiadne rozdiely medzi vzorkami získanými odbermi z hadičky alebo vpichom do cievy^{26,27}.
- Komplexný prehľad faktorov, ktoré prispievajú k falošne pozitívnym výsledkom 1→3)-β-D-glukánu, pozrite si prácu Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)³⁰.
- Testovacie hladiny boli stanovené u dospelých účastníkov. Normálne a limitné hodnoty u dočiat a detí sú predmetom výskumu^{28,29}.

13. Parametre výkonu

13.1 Hraničné a očakávané hodnoty

Multicentrická prospektívna štúdia¹¹ vykonaná s cieľom určiť diagnostickú citlivosť a diagnostickú špecifickosť testu Fungitell® (pozrite si porovnáacie testy nižšie) ukázala, že hodnoty betaglukánu sú zvýšené pri rôznych hubových infekciách. Ak sú pri hladine 80 pg/ml alebo viac prítomné známky a príznaky, prediktívna hodnota, že účastník je testovaný pozitívne na plesňovú infekciu sa pohybuje v rozmedzí 74,4 až 91,7 %. V prípade neprítomnosti známk a príznakov pri hladine do 60 pg/ml sa negatívne prediktívne hodnoty pohybovali v rozmedzí 65,1 % až 85,1 %.

13.2 Klinický výkonn

Uskutočnila sa multicentrická, prospektívna štúdia na validáciu parametrov výkonu testu Fungitell®²¹. Test bol porovnávaný s inými štandardnými metódami detekcie (t. j. kultivácia krvi, histopatologické vyšetrovanie vzorky z biopsie a rádiologické znaky) mykôz a fungémií.

Pomocou testu sa vyšetrilo tristo päťdesiatdeväť (359) účastníkov. Od každého účastníka sa odobrala jedna vzorka. K nízkorizikovým účastníkom patrili zjavne zdraví jednotlivci a jednotlivci na klinických pracoviskách hospitalizovaní z iných dôvodov než pre plesňové infekcie. Nábor účastníkov prebiehal na šiestich klinických pracoviskách v USA. Štyri z týchto klinických pracovísk vykonali test a vyšetrili celkovo 285 vzoriek. Spoločnosť ACC otestovala všetkých 359 vzoriek dvakrát, ale len druhý súbor výsledkov sa použil na stanovenie výkonu testu. Výsledky z druhého súboru analýz sa štatisticky nelíšili od prvého súboru.

• Diagnostická citlivosť'

Citlivosť pre celú populáciu účastníkov (359), vrátane pacientov s kryptokokózou, bola 65,0 % ([60,1 – 70,0 %, 95 % interval spoľahlivosti (CI)]) (tabuľka 1).

• Diagnostická špecifita

Špecifita bola 81,1 % (77,1 – 85,2 % CI). Pri analýze 170 osôb negatívnych na plesňovú infekciu a zjavne zdravých osôb bola špecifita testu 86,5 % (82,8 % – 90,1 % CI). Po zaradení ďalších 26 účastníkov, ktorí boli negatívni na plesňovú infekciu, ale mali iné poruchy, sa zistila špecifita na úrovni 81,1 % (77,1 – 85,2 % CI).

Tabuľka 1	Výsledky testovania spoločnosťou ACC pri hraničnej hodnote 60 – 80 pg/ml podľa pracoviska							
Pracovisko	Preukázaná/pravdepodobná citlivosť ≥80 pg/ml		Špecifita <60 pg/ml				Spolu	
	Poz.klin. Poz.	Citlivosť'	Pozitívna prediktívna hodnota	Neg.klin. Neg.	Špecifita	Negatívna prediktívna hodnota		Nejehoznámené (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	nerlevantné	0/0	nerlevantné	0,0	0	1
Spolu	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Pri porovnaní výsledkov získaných spoločnosťou ACC (359 vzoriek) a klinickými pracoviskami (285 vzoriek) s klinickou diagnózou, bola citlivosť na úrovni 64,3 % (58,8% – 69,9 % CI) pre ACC a 61,5 % (55,9% – 67,2 % CI) pre pracoviská. Špecifita bola 86,6 % (82,7% – 90,6 % CI) pre ACC verzus 79,6 % (74,9 % – 84,3 % CI) pre pracoviská.

Kandidiáza

V prospektívnej štúdií bolo 107 účastníkov, u ktorých bola pozitívne diagnostikovaná kandidiáza. 83 zo 107 boli pozitívni v teste Fungitell®.

Spoločnosti Associates of Cape Cod, Inc. bolo poskytnutých stosedemdesiatpäť knižničných hodnôt kandidiázy. 145 zo 175 boli v teste pozitívnych.

Aspergilóza

Celkovo bolo na aspergilózu pozitívnych 10 osôb. Z 10 osôb bolo 8 pozitívnych na základe testu.

Fusarióza

Traja účastníci boli pozitívni na fuzariózu. Dvaja z troch boli pozitívni na základe testu.

Antimykotická liečba

Prítomnosť alebo neprítomnosť antimykotickej liečby nemala štatisticky významný vplyv na citlivosť testu. U 118 účastníkov bola dokázaná pozitívna invazívna hubová infekcia a antimykotická liečba. Test bol pozitívny u 82 pacientov (citlivosť 69,5 %; CI 61,2 – 77,8 %). Okrem toho sa u dvadsiatich štyroch (24) účastníkov preukázala pozitívna reakcia, ale nežívali žiadnu antimykotickú liečbu. U 18 z nich bol test pozitívny (citlivosť 75 %; CI 57,7 % – 92,3 %).

13.3 Korelácie testu

Štyri z klinických pracovísk analyzovali celkovo 285 vzoriek. Výsledky testov z pracovísk korelovali s výsledkami spoločnosti Associates of Cape Cod, Inc. kvantitatívne na úrovni 96,4 %. Korelácie spoločnosti Associates of Cape Cod, Inc. s jednotlivými testujúcimi pracoviskami sa pohybovali v rozmedzí 90,6 až 99,2 %.

13.4 Zhodnosť'

Test Fungitell® sa hodnotil z hľadiska presnosti (t. j. opakovateľnosti a reprodukovateľnosti) pomocou desiatich (10) rôznych vzoriek, z ktorých každá bola testovaná na troch testovacích miestach v troch rôznych dňoch. Variabilita v rámci testu sa pohybovala od 0,9 do 28,9 % a slúžila ako mera opakovateľnosti. Variabilita medzi testami sa pohybovala od 3,9 do 23,8 % a slúžila ako mera reprodukovateľnosti. Z oboch analýz boli vylúčené štyri (4) negatívne vzorky.

13.5 Rozsah merania a linearita

Výsledky sú vyjadrené v pg/ml séra a v rozsahu od nedetegovateľných (<31 pg/ml) po >500 pg/ml. Vytlačí ich softvér alebo sa odčitajú z krivky štandardu. Ak chcete získať presné hodnoty nad 500 pg/ml, vzorku treba zriediť s vodou LAL a opätovne testovať. Ako je uvedené v časti Kontrola kvality, korelačný koeficient (r) štandardnej krivky (lineárna verzia lineárna) pokrývajúcej merací rozsah testu Fungitell® by mal byť* 0,980 a negatívne kontroly by mali mať hodnoty rýchlosti (napr. miliabsorpné jednotky za minútu) nižšie ako 50 % najnižšej štandardnej rýchlosti. V opačnom prípade sa test musí zopakovať s novými reagenciami.

13.6 Látky ovplyvňujúce test

Nasledujúce stavy vzorky môžu ovplyvniť presnosť výsledku testu Fungitell®:














- Vyblednuté alebo zakalené zrká, napríklad výrazne hemolyzované, lipemické alebo obsahujúce nadmerné množstvo bilirubínu, môžu opticky narušiť test. V prípade merania týchto vzoriek je potrebné preskúmať výsledky testov s cieľom overiť optickú interferenciu alebo neobvyklé kinetické vzory.
- Zvýšené hladiny imunoglobulínu G, ktoré môžu existovať v sére napríklad v dôsledku mnohónásobného myelómu, môžu viesť k vyzrážaniu vzorky v reakčnej zmesi pri pridaní testu Fungitell® do predprípraveného séra⁹⁰.

- V čase písania tohto článku nebol opísaný žiadny iný aktívajúcí faktor G ((1→3)-β-glukánový detekčný prvok) činnida Fungitell® ako 1→3)-β-glukán. V niektorých štúdiách, v ktorých sa tvrdilo o skříženej reaktivite, sa pri ošetroení predpokladaného aktivačného materiálu purifikovanou (1→3)-β-glukanózou signál eliminoval, čím sa preukázalo, že pozorovaná aktívacia bola spôsobená kontaminujúcim (13)-β-glukánom⁹¹. Kontaminácia serinovými proteázami môže tiež viesť k uvoľňovaniu para-nitroanilínu v reakčných zmesiach Fungitell®, ale tieto sú inaktívované v rámci procesu predbežnej úpravy.

14. Metaanalýzy

Okrem toho boli publikované mnohé odborné recenzované štúdie na tému podpory diagnostiky invazivných plesňových ochorení na základe (1→3)-β-D-glukánu v sére, vrátane meta-analýz diagnostickej výkonnosti^{22, 34, 35, 36, 37}.

15. Legenda k symbolom

	„Použiť do“		„Pozrite si návod na použitie“
	„Obsah postačuje na „N“ testov“		„Autorizovaný zástupca“
	„Kód šarže“		„Značka CE“
	„Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro“		„Len na lekársky predpis“
	„Katalógové číslo“		„Upozornenie“
	„Obmedzenie teploty“		„Chrňte sa pred snečným svetlom!“
	„Výrobca“		

16. Autorizovaný zástupca

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

Poznámka: Závažná udalosť, ktorá sa stala v súvislosti s pomockou, sa oznámí výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ a/alebo pacient sídlo alebo bydlisko.

17. Kontaktné informácie

Corporate Headquarters

Associates of Cape Cod, Inc.

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

Tel.: (888) 395-2221 alebo (508) 540-3444 • Fax: (508) 540-8680

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

Spojené kráľovstvo

Associates of Cape Cod Int'l, Inc.

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

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

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

Európa

Associates of Cape Cod Europe GmbH

Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Nemecko

Tel.: (49) 61 05–96 10 0

18. História revízií

Rev. 0 po 11: Zmena trojitého testovania na dvojité testovanie. Vymenili ste vodu reagenčnej kvality za vodu reagenčnej kvality LAL. Skombinované zložky KCL a KOH do alkalického roztoku na predúpravu. Odstránená mikrotitračná platnička zo súpravy a ponuka ako požadovaná, ale nedodávaná položku. Zmena zástupcu pre ES a prídanie austrálskeho garanta. Drobné objasnenia, formátovanie, doplnenie symbolov, ďalšie rušivé látky.

Rev. 12: Odstránenie spoločnosti Emergo Europe ako zástupcu pre ES.

19. Referencie

- Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-g-tan 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-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.
- 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.

10. Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transp. Infectious Dis. 2002: 4 (Suppl. 3):32-37

11. Lass-Flörl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.

12. Nucci, M. and Anaisie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.

13. Livintseva, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grgruch, 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.

14. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, 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.

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

16. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (1→3)-β-D-Glucans. Carbohydrate Res. 218:167-174.

17. Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-β-D-Glucans in the activation of coagulation factor G from *Limulus* amoebocyte lysate and host-mediated anticomul activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.

18. Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and Saito, H. 1993. Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-β-D-Glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.

19. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. Kidney International 60: 319-323.

20. Kato, A., Takita, T., 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., Amezki, K., Endo, S., Aoyagi, T., Iden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y., and Kaki, 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., Coanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-g-tan (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. Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T. and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-β-D-Glucan in human blood. Clin. Chim. Acta 226: 109-112.

25. Ogawa, M., Hori, H., Niguchi, S., Azuma, E., and Komada, Y. 2004. False positive plasma (1→3)-β-D-Glucan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. Int. J. Hematol. 80: 97-98.

26. Raci, Z., Koemanova, I., Lengerova, M., Weinbergrova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, L., 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.

27. Postoraro 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.

28. Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., and Steinbach, W.J. 2007. (1→3)-β-D-Glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-g-tucan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924-925.

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

30. Issa, N.C., Koo, S., Lynch, R.C., Gay, C., Hammond, S.P., Baden, L.R., Ghobrial, I.M., Finkelman, M.A., and Marty, F.M., 2012 Serum galactomannan and (1→3)-β-d-glucan assays for patients with multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia. J.Clin. Microbiol. 50:1054-6.

31. Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, 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.

32. 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.