

Test na (1→3)-β-D-Glukan v séru
TEST FUNGITELL®
Návod k použití

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Telephone: (508) 540-3444</p> <p>Bez poplatku: (888) 396-2221</p> <p>Fax: (508) 540-9680</p> <p>Technická podpora: (800) 848-3248</p> <p>Zákaznické služby: (800) 525-8378</p> </div> <div> <p>R_K only</p> <p>IVD</p> <p>42</p> <p>CE</p> </div> </div>
PN001268-es rev. 13 REF: FT001 2024-09-05

	
----------------------------	----------------------------

Návod k použití e vašem jazyce vyhledejte na www.acciusa.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 plísní důležitých z lékařského hlediska¹, lze použít jako pomůcku při diagnostice hlubokých mykóz a fungemií². 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
<i>Tyto informace poskytněte objedávajícímu lékaři: Některé plísně, např. rod <i>Cryptococcus</i>, 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^{3,4}. Nízké titry (1→3)-β-D-glukanu v séru byly pozorovány také u infekcí plísněmi řádu <i>Mucorales</i>, např. <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> a <i>Rhizopus</i>^{1,4}, u kterých není známo, že by produkovaly (1→3)-β-D-glukan. Dále také kvasinková fáze <i>Blastomyces dermatitidis</i> produkuje málo (1→3)-β-D-glukanu a test ji nemusí detekovat⁵.</i>
Do hlášení výsledků testu Fungitell® zahrňte toto prohlášení.

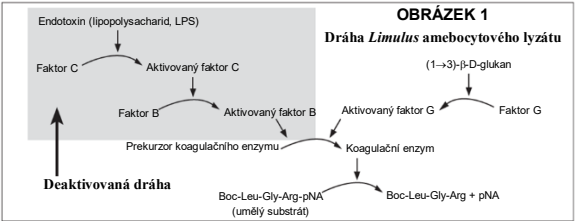
2. Souhrn a vysvětlení

Výskyt plísňových infekcí oportunními patogeny, obzvláště u pacientů se sníženou imunitou, se zvyšuje^{6,7,8}. 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^{9,10}. 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 střevech a sliznicích^{11,12}. Diagnózy invazivních mykóz a fungemií jsou obvykle založeny na spesifických diagnostických nebo radiologických technikách. K dostupným diagnostickým metodám nedávno přibýly biologické markery plísňové infekce².

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^{1,8,13,14}.

3. Princip metody

Test Fungitell® měří (1→3)-β-D-glukan. Test je založen na modifikaci dráhy *Limulus* ameobocytový lžát (LAL)^{15,16,17,18}, obrázek 1. Reagencie Fungitell® je modifikována tak, aby nereagovala s bakteriálními endotoxiny a reagovala pouze s (1→3)-β-D-glukanem prostřednictvím faktorem G mediaované strany dráhy. (1→3)-β-D-glukan aktivuje faktor G, zymogen serinové proteázy. Aktivovaný faktor G přeměňuje neaktivní prekurzor koagulačního enzymu na aktivní koagulační enzym, který štěpí para-nitroanilid (pNA) z chromogenického substrátu peptidů Boc-Leu-Gly-Arg-pNA a vytváří chromofor, para-nitroanilin, který je absorbován při 405 nm. Niže popsany 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. Niže 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 ameobocytový lžát (tj. z ostrorepa) 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 puftrem.*
- 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:** 20 ml 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 úroveň (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 reagenčíí 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®
- 96jamkové mikrodestičky* **Poznámka:** Test Fungitell® byl validován s destičkami, které mají následující charakteristiky: polystyrenové, sterilní, nepotahované, s plochým dnem, prosté rušivého beta glukanu (podle specifikace ACC) a jednotlivé balené.

* Tyto výrobky, dodávané společností Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), jsou certifikovány jako neobsahující interferující hladiny glukanů.

6. Uchovávání reagenčí

- Všechny reagencie uchovávejte v původním obalu, v temnu a při teplotě 2–8 °C.
- Rekonstituovanou reagenčí Fungitell® uchovávejte při teplotě 2–8 °C a použijte ji do 2 hodin. Alternativně můžete rekonstituovanou reagenčí 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 reagenциmi soupravy, nekuřte, nejzete 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. obraťte 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.acciusa.com.

7.1 Procedurální opatření

Test Fungitell® vyžaduje, aby byla věnována důkladná pozornost technice a testovacímu prostředí. Důkladné výškolení technika v metodě testu a vyhnutí se kontaminaci prostředí jsou kriticky důležité faktory pro účinnost testu.

- Použijte 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, oděvů, 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 vátovými zátkami a pipetovací špičky s celulózoými filtry. Vysoká množství (1→3)-β-D-glukanu mohou vylučovat také chirurgické zářové bandáže a houby^{21,22}. Další zdroje kontaminace souvisejí s pacientem nalezené 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).
- Uchovávání 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 shromažděné 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 použít obě vlnové délky, ale pokud nemáte k dispozici čtení při dvou vlnových délkách, odečtete test při 405 nm a zkontrolujete kinetickou křivku každého patientského vzorku, zda nevykazuje známý 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 lineárními/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 rekonstituuje promícháním na třepačce po dobu minimálně 30 sekund při střední až středně vysoké rychlosti (roztok 1). Roztok glukanu je nutno skladovat při teplotě 2–8 °C a použít do 3 dnů. Niže 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 trojhrubovky na jednovláknové glukany^{17,18}, které jsou v testu reaktivnější. Alkalické pH navíc slouží k inaktivaci sérových proteáz a inhibitorů, které by mohly s testem interferovat.²⁴

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
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 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 připravené v části 8.2 výše. To proto, že objem standardu používaný v testu je 25 µl na jamku, což je pětinásobek objemu použitého vzorku séra (viz část 8.5 b. níže). Vzorky séra jsou tedy ve skutečnosti pětkrát zředěnější než standardy. Toto ředění je kompenzováno vynáobením 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

- Zmražené vzorky séra nechte rozmrazit při pokojové teplotě. Všechny vzorky dobře promíchejte na třepačce - minimálně 30 sekund při střední až středně vysoké rychlosti.
- Přeneste 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 Rekonstiuce reagencie Fungitell®

Poznámka: Tento krok lze snadno provést v době, kdy probíhá inkubace s roztokem pro předběžnou úpravu. Konzistentnost času rekonstiuce zvýší reprodukovatelnost, protože reakce testu Fungitell® začíná po rekonstiuaci, i když na nízké úrovni.

Zrekonstituujte jednu injekční lahvičku reagencie Fungitell® přidáním 2,8 ml LRW a poté přidáním 2,8 ml rekonstitučního pufru Pyrosol pomoci 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 negatívních 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 standardu:

- a. Přidejte 25 µl LRW do jamek G2 a G3.
- b. Přidejte 25 µl standardního roztoku 5 o koncentraci 6,25 pg/ml do jamek F2 a F3 označených 31,25 pg/ml.
- c. Přidejte 25 µl standardního roztoku 4 o koncentraci 12,5 pg/ml do jamek E2 a E3 označených 62,5 pg/ml.
- d. Přidejte 25 µl standardního roztoku 3 o koncentraci 25 pg/ml do jamek D2 a D3 označených 125 pg/ml.
- e. Přidejte 25 µl standardního roztoku 2 o koncentraci 50 pg/ml do jamek C2 a C3 označených 250 pg/ml.
- f. Přidejte 25 µl standardního roztoku 1 o koncentraci 100 pg/ml do jamek B2 a B3 označených 500 pg/ml.

8.8 Přidání reagencie Fungitell® a proces inkubace destičky

- Přidejte 100 µl reagencie Fungitell® do každé jamky (obsahující negativní kontroly, standardy a vzorky) pomoci krovovací (opakovací) pipety.
- Vložte destičku do čtečky mikrodestiček (vyteperované na 37 °C), sejměte z ní víko a nechte ji protřepat po dobu 5–10 sekund. Pokud ve čtečce mikrodestiček není k dispozici funkce třesení destičky, můžete použít externí třepačku na mikrodestičky.

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

29. Goudjil S, Kongofo G, Dasol 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 Martyr F M., 2012 Serum galactomannan and (1→3)-β-D-glucan assays for patients with multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin. Microbiol* 50:1054-6.
31. Ostrosky-Zeichner L, Alexander B.D, Kett D.H., Vazquez J., Pappas P.G., Sasaki 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. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2011; 52:750-70.
33. Hou TY, Wang SH, Liang SX, Jiang WX, Luo DD, Huang DH. The Screening Performance of Serum 1,3-Beta-D-Glucan in Patients with Invasive Fungal Diseases: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS One.* 2015 Jul 6;10:e0131602.
34. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. 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 (ECL-3). *Clin Infect Dis.* 2012; 54:633-43.
35. Onishi AI, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for Pneumocystis jirovecii 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;48:551-61.
38. Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role of (1→3)-β-D Glucan. *PLoS One.* 2016 Oct 20;11(10):e0164978. doi: 10.1371/journal.pone.0164978. eCollection 2016.
39. Finkelman M. Specificity Influences in (1→3)-β-d-Glucan-Supported Diagnosis of Invasive Fungal Disease. *J. Fungi (Basel)* 2020 Dec 29;7(1):14

Další odkazy najdete na našem webu [Fungitell.com](https://www.fungitell.com)

Stručný přehled testovacího postupu si můžete stáhnout z webu [Fungitell.com](https://www.fungitell.com) na adrese: https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf