

Stanovení pro (1→3)-β-D-glukanu v séru	
<b>FUNGITELL®</b>	
<i><b>Návod k použití</b></i>	
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>Telefon: +1 508 540-3444</p> <p>Bezplatné telefonní číslo:+1 888 395-2221</p> <p>Fax: +1 508 540-8680</p> <p>Technická podpora: +1 800 848-3248</p> <p>Služba zákazníkům: +1 800 525-8378</p> </div> <div style="text-align: right;"> <p>42</p>  </div> </div>
PN001268-cs	Rev 000 Revidováno v prosinci 2007

#### ÚČEL POUŽITÍ

Fungitell test je kolorimetrická analýza založená na aktivizaci proteázového zymogenu, kterou je možno použít pro kvalitativní detekci (1→3)-β-D-glukanu v séru pacientů s predispozicí a nebo se symptomy invazivní houbové infekce. Přítomnost (1→3)-β-D-glukanu (jako hlavních složky buněčné stěny řady klinicky důležitých mikroskopických hub) v séru pacienta lze použít jako pomůcku při diagnostice hluboce uložených mykóz a fungémie. Pozitivní výsledek však neidentifikuje třídu hub způsobující infekci.

Toto stanovení je možné využít pro presumptivní diagnózu houbových infekcí. Mělo by být doplněno dalšími diagnostickými vyšetřeními, jako např. mikrobiologickou kultivací, histologickým vyšetřením bioptických vzorků a radiologickým vyšetřením.

<p><b>Důležité - Doporučujeme, aby níže uvedené informace byly poskytnuty ošetřujícímu lékaři:</b></p> <p>Stanovení Fungitell nedetekuje určité druhy mikroskopických hub, např. rod <i>Cryptococcus</i> (9), který produkuje velmi nízké hladiny (1→3)-β-D-glukanu. Stanovení rovněž nedetekuje zygomycety, např. <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> a <i>Rhizopus</i> (17), o kterých není známo, že by produkovaly (1→3)-β-D-glukan. Kromě toho kvasinková fáze <i>Blastomyces dermatitidis</i> produkuje málo (1→3)-β-D-glukanu a nemusí být detekována tímto stanovením (18).</p> <p><b>Přiložte toto sdělení ke zprávě s výsledky testu na přítomnost glukanu.</b></p>
--

#### SOUHRNNÉ INFORMACE A VYSVĚTLENÍ

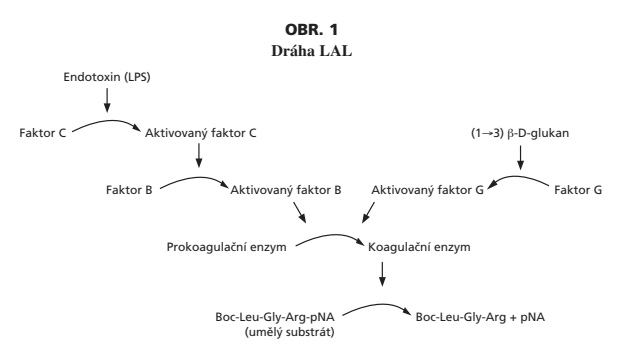
Zejména u imunodepresivních pacientů existuje zvýšený výskyt houbových infekcí jak primárními, tak oportunními patogeny (2,3,4). Invazivní houbová onemocnění, např. oportunní infekce, jsou časté mezi pacienty s hematologickou malignitidou a AIDS a odpovídají za vzrůstající počet nozokomiálních infekcí zejména mezi příjemci transplantovaných orgánů a dalších pacientů podrobujících se imunosupresivní léčbě (1,4). Mnohá houbová onemocnění jsou získána vdechováním plísňových spor pocházejících z půdy, zbytků rostlin, klimatisačních systémů a/nebo exponovaných povrchů. Některé oportunní plísně jsou přítomny v/na lidské kůži, v gastrointestinálním traktu a na sliznicích (7). Diagnostika invazivních mykóz a fungemie je obvykle založena na nespecifických diagnostických nebo radiologických technikách.

Častými primárními lidskými plísníovými patogeny jsou *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. Oportunní plísněové patogeny zahrnují druhy *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* a *Pneumocystis carinii*. (1→3)-β-D-glukan produkovaný těmito a dalšími organizmy může být detekován stanovením Fungitell (4,5, 16).

#### PRINCIP POSTUPU

Stanovení Fungitell měří hladiny (1→3)-β-D-glukanu. Toto stanovení je založeno na modifikaci dráhy lyzátu LAL (*Limulus* Amebocyte Lysate) (8-11), obr. 1. Fungitell činidlo bylo modifikováno za účelem eliminovat faktor C, tak aby činidlo reagovalo pouze s (1→3)-β-D-glukanem prostřednictvím té části dráhy, která je zprostředkována faktorem G.

(1→3)-β-D-glukan aktivuje faktor G, zymogen serinové proteázy. Aktivovaný faktor G mění inaktivní prokoagulační enzym na aktivní koagulační enzym, který odštěpením pNA z chromogenního peptidového substrátu vytváří chomofor absorbující při 405 nm. Kinetická varianta Fungitell testu, jak je popsána níže, je založena na měření rychlosti změny absorbance ve vzorku. Koncentrace (1→3)-β-D-glukanu ve vzorku je pak odhadnuta srovnáním naměřených hodnot absorbance vzorku a kalibrační křivky.



#### MATERIÁLY DODANÉ SE SOUPRAVOU FUNGITELL

Souprava Fungitell je *in vitro* diagnostikum. Níže uvedené materiály jsou součástí Fungitell sady a jejich objemové množství je postačující pro 110 testů na dvou mikrotitračních destičkách (55 jamek na destičku):

- Fungitell činidlo, lyofilizovaný LAL lyzát specifický pro (1→3)-β-D-glukan (dvě lahvičky)
- Pyrosol, pufr pro rekonstituci Fungitell činidla, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (dvě lahvičky)
- Standard, lyofilizovaný glukan (pachyman) s inertním plnidlem - množství glukanu je uvedeno na štítku (dvě lahvičky).
- Voda reagenční čistoty (RGW) (dvě lahvičky)
- Mikrotitrační destičky Pyroplate: 96ti jamkové destičky, nepotažené, s rovným dnem a krytem, bez interferujících glukanů (dvě).
- KCl 1,2 M (jedna lahvička)
- KOH 0,25 M (jedna lahvička)

Všechny výše uvedené materiály s výjimkou standardu jsou prosté interferujících hladin (1→3)-β-D-glukanu.

#### POŽADOVANÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ KITU

Všechny materiály musí být prosté interferujících glukanů. Skleněné nádoby musí být depyrogenizovány suchým teplem při teplotě alespoň 235 °C po dobu 7 hodin (popř. jiným postupem, řádně validovaným), aby byly vhodné pro použití.

- Špičky na mikropipety \* (250 μL – kat. č. PPT25, 1000 μL - kat. č. PPT10)
- Nastavitelné digitální mikropipety pro objemy od 5 do 25 μL a 100 do 1000 μL
- Opakovatelná nastavitelná pipeta s dávkovačem na 100 μL
- Zkumavky\* pro přípravu kalibrační křivky a činidla pro úpravu séra. (13 x 100 mm borosilikátové sklo – kat. č. TB013)
- Mikrodestičkový reader s teplotní regulací (37 °C) umožňující kolorimetrické měření při 405 a 490 nm s dynamickým rozsahem nejméně do 2 Abs. Počítačový software vhodný pro kinetické stanovení.
- Sterilní zásobní zkumavky bez stopových množství glukanu pro alikvotaci vzorku (většina zkumavek certifikovaných na nepřítomnost RNase, DNase a pyrogenů také neobsahují interferující množství (1→3)-b-á D-glukanu).
- Parafilm®

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

**Pozor** – skleněné pipety s vatovými zátkami jsou potenciálním zdrojem kontaminace glukanem.

#### VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ

*Tento produkt je IN VITRO DIAGNOSTIKUM.*

<p>Fungitell test vyžaduje důsledné dodržování správné laboratorní techniky a udržování čistého laboratorního prostředí. Důkladné proškolení laboranta v metodě stanovení a zamezení kontaminace je kritické pro reprodukovatelnost testu.</p>
--

- Druhy nedetekovatelné Fungitellem. Některé druhy mikroskopických hub, které produkují velmi nízké hladiny (1→3)-β-D-glukanu, obvykle nejsou stanovením Fungitell zachyceny. Mezi ne patří houby rodu *Cryptococcus* (14,16) a také zygomycety, např. *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus* (16,17). Dalším příkladem je *Blastomyces dermatitidis*, který produkuje nízké hladiny (1→3)-β-D-glukanu ve své kvasinkové formě a proto obvykle není detekován Fungitellem (18).
- Nepipetujte žádný materiál ústy. V prostorách, ve kterých se manipuluje se vzorky nebo s činidly soupravy, nekuřte, nejezte ani nepijte.
- Vytvořte čisté prostředí pro provádění této analýzy. Používejte pouze materiály certifikované na nepřítomnost interferujících (1→3)-β-D-glukanů. Upozorňujeme, že kontaminace glukanem a plísněmi pocházejícími z lidského těla, oblečení, zkumavek, vody a z prachu obsaženým ve vzduchu může interferovat.

- Nepoužívejte reagentce po uplynutí expirační doby.
- Vzorky pochybné barvy nebo zakalené vzorky (jako např. vzorky silně hemolyzované, lipemické nebo obsahující nadměrné množství bilirubinu) mohou způsobit interferenci. Pokud takové vzorky jsou testovány, při vyhodnocování výsledků je nutno odhalit potenciální optickou interferenci a/nebo neobvyklé kinetické trendy.
- Během manipulace se vzorky pacientů používejte vhodný ochranný oděv a pomůcky včetně ochranných rukavic bez pudru.
- Sérum hemodialyzovaných pacientů může obsahovat vysoké hladiny (1→3)-β-D-glukanu, jestliže se použijí určité celulózové dialyzační membrány (13). Hemodialýza s celulózovými triacetátovými membránami nebo polymethyl metakrylátovými membránami nemá vliv na stanovení.
- Chirurgické gázy a tampony mohou vylučovat vysoké hladiny (1→3)-β-D-glukanu, které se mohou podílet na přechodné pozitivním výsledků způsobeným kontaminací. Tento fenomén byl pozorován především u po-operačních pacientů (6).
- Soupravy s poškozeným obsahem nesmí být použity.
- Materiály vystavené potenciálně kontaminovaným tekutinám (obsahujícím patogeny) musí být zlikvidovány v souladu s místními předpisy.

#### Uchování reagentcí

Všechny reagentce uchovávejte v temnu při teplotě 2-8°C, tak jak byly dodány. Rekonstituované Fungitell činidlo musí být uchováváno při teplotě 2-8 °C a použito během dvou hodin nebo může být zmrazeno v -20°C po dobu až 20ti dnů, následně jednou rozmrazeno před použitím.

#### Manipulace se vzorky

- Odběr vzorků: Vzorky séra musí být odebrány do sterilních vakuovaných zkumavek (s červenými víčky) nebo do sérových separačních zkumavek (SST), a ponechány v klidu pro vytvoření sraženiny. Poté je sérum odděleno od sraženiny a slito do vhodné zkumavky bez intereferujících (1→3)-β-D-glukanů.
- Uchování vzorků: Vzorky séra lze uchovávat před stanovením při teplotě 2-8 °C nebo zmrazené při teplotě -20 °C nebo nižší.
- Označování vzorků: Vzorky musí být zřetelně označeny v souladu se schválenými předpisy dané instituce.

#### POSTUP

Poznámka: Nastavení se může u jednotlivých přístrojů a softwarů lišit. Obecně však platí, že software vhodný pro daný reader je nastaven v režimu Vmean. Při zadávání testu do softwaru postupujte podle návodu k použití, tak aby vypočítaná hodnota byla rovna průměrné rychlosti změny absorbance všech naměřených bodů. Interval mezi jednotlivými odečty by měl být 15 až 30 sekund. Vlnové délky musí být v softwaru nastaveny na 405 nm a 490 nm pro odečet pozadí. Jestliže reader nemá možnost odečtu při duální vlnové délce, odečítejte pouze při 405 nm. Inkubační teplota je 37°C. Obsah destičky musí být promíchán po dobu 5 až 10 sekund těsně před zahájením odečtu. Použijte lineární kalibrační křivku nebo jiný ekvivalent. Odečet začíná neprodleně po vložení destičky bez lag fáze.

- Příprava standardu glukanu dodaného v soupravě.
  - Rozpusťte obsah jedné lahvičky glukanu v RGW (objem je uveden na lahvičce), abyste získali zásobní roztok o koncentraci 100 pg/mL. Vortexujte nejméně 30 sekund, aby se standard řádně rozpustil (roztok 1). Zásobní roztok musí být uchovávan při 2 – 8°C a musí být použit během tří dnů. Níže uvedené body „b až e“ demonstrují příklad přípravy kalibrační křivky.
  - Připravte standard o koncentraci 50 pg/mL smícháním 500 mL RGW a 500 mL roztoku 1 ve zkumavce bez glukanu (roztok 2). Vortexujte alespoň 10 sekund.
  - Připravte standard o koncentraci 25 pg/mL smícháním 500 mL RGW a 500 mL roztoku 2 ve zkumavce bez glukanu (roztok 3). Vortexujte alespoň 10 sekund.
  - Připravte standard o koncentraci 12.5 pg/mL smícháním 500 mL RGW a 500 mL roztoku 3 ve zkumavce bez glukanu (roztok 4). Vortexujte alespoň 10 sekund.
  - Připravte standard o koncentraci 6.25 pg/mL smícháním 500 mL RGW a 500 mL roztoku 4 ve zkumavce bez glukanu (roztok 5). Vortexujte alespoň 10 sekund.
- Příprava činidla pro úpravu séra. Alkalické činidlo pro úpravu séra přeměňuje konformaci glukanu v séru z triple-helix na single-strand (10,11), která je více reaktivní. Vysoké pH rovněž inaktivuje serinové proteázy a serin-proteázové inhibitory v séru, které by mohly produkovat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky (20).
  - Připravte činidlo pro úpravu séra smícháním stejného objemu 0,25 M KOH a 1,2 M KCl a dobře promíchejte. Doporučujeme použít až 900 každého činidla, výsledný objem je pak postačující pro dva experimenty. Uzavřete otvor lahvičky Parafilmem a uchovejte pro druhý experiment. Použijte tu část Parafilmu, která byla orientována směrem k papírové podložce.

Poznámka: Pro vynesení do grafu vynásobte jednotlivé koncentrace standardu při 6. Výsledný referenční rozsah křivky je 31 až 500 pg/mL. Koncentrace zadejte do softwaru ve stejném formátu (500, 250, 125, 62.5 a 31 pg/mL).

*Objem standardu ve stanovení je 25 μL na jamku nebo pětínásobek objemu vzorku séra. Mikrotitrační destička se standardy (St), negativními kontrolami (Neg) a 21 neznanými vzorky (Uk) (všechny zastoupeny duplicitně) je připravena následujícím způsobem:*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		St1	St1		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
C		St2	St2		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
D		St3	St3		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
E		St4	St4		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
F		St5	St5		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
G		Neg	Neg		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
H												

Poznámka 1: Vnější jamky mikrodestičky lze použít v případě, že jsou jejich kinetické charakteristiky srovnatelné s vnitřními jamkami.
Poznámka 2: Po napipetování vzorku a všech reagentcí do příslušných jamek, uzavřete destičku krytem, aby se zamezilo náhodné kontaminaci jednotlivých jamek. Kryt odstraňte až těsně před vložením destičky do readeru, čímž se předejde optické interferenci způsobené kondenzací.

- Přidání séra a činidla pro úpravu séra.
  - Zmražené vzorky séra nechejte rozmrazit při pokojové teplotě a dobře promíchejte vortexováním.
  - Přeneste 5 μL vzorku séra do jednotlivých jamek označených (Uk), alespoň ve dvou opakováních. Proveďte totéž se všemi vzorky.
  - Přidejte 20 μL činidla pro úpravu séra do každé jamky se sérem*Poznámka:* Kroky b a c lze provádět v obráceném pořadí podle preference laboranta.
  - Třepete destičkou po dobu 5 az 10 sekund, aby se obsah řádně promíchá (lze využít funkci pro míchání na fotometru), poté inkubujte 10 minut při teplotě 37 °C ve fotometru.
- Rekonstituce Fungitell činidla. Poznámka: Lze provést během výše popsané inkubace pro úpravu séra.
  - Rekonstitujte obsah Fungitell lahvičky nejdříve přidáním 2,8 mL RGW a následným přidáním 2,8 mL pufru Pyrosol (použijte mikropipetu na 1000 μL). Používejte tu část Parafilmu, která byla orientována směrem k papírové podložce. Otáčejte lahvičkou až do úplného rozpuštění činidla – nevortexujte.
- Přidání negativních kontrol a standardů. Po skončení inkubace pro úpravu séra (krok 3.d), vyjměte destičku z readeru a přidejte standardy a negativní kontroly.
  - Napipetujte 25 μL RGW do jamky G2 a G3.
  - Napipetujte 25 μL roztoku 5 o koncentraci glukanu 6.25 pg/mL do jamky F2 a F3.
  - Napipetujte 25 μL roztoku 4 o koncentraci glukanu 12.5 pg/mL do jamky E2 a E3.
  - Napipetujte 25 μL roztoku 3 o koncentraci glukanu 25 pg/mL do jamky D2 a D3.
  - Napipetujte 25 μL roztoku 2 o koncentraci glukanu 50 pg/mL do jamky C2 a C3.
  - Napipetujte 25 μL roztoku 1 o koncentraci glukanu 100 pg/mL do jamky B2 a B3.
- Přidání Fungitell činidla a způsob inkubace mikrodestiček.
  - Do každé jamky (obsahující negativní kontroly, standardy a vzorky) přidejte 100 μL Fungitell činidla. Použijte opakovatelnou pipetu.
  - Vložte destičku s víčkem do fotometru (vytemperovaného na 37°C) a nechte protřepat na 5-10 sekund. Následně odstraňte víčko a odečítejte data při vlnové délce 405 nm a 490 nm po dobu 40 minut při teplotě 37 °C. Jestliže funkce míchání není u fotometru k dispozici, můžete použít externí třepačku mikrodestiček.
  - Vyhodnocení analýzy: vypočítejte průměrnou rychlost změny absorbance (v mili-absorbančních jednotkách za minutu) pro všechny naměřené body v době mezi 0 až 40 minutami.

#### INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky Fungitell testu slouží jako pomůcka pro diagnostiku invazivní houbové infekce. Výsledky jsou vyjádřeny v pg na mL séra a pohybují se v rozsahu od nedetekovatelných (<31 pg/mL) po > 500 pg/mL. Mohou být vytištěny použitým programem nebo odečteny z kalibrační křivky. Pro přesnou kvantifikaci hladin nad 500 pg/mL je nutno vzorek naředit RGW a znovu otestovat.

Laboratoř provádějící tento test musí informovat objedávajícího lékaře, že test Fungitell nedetekuje určité druhy mikroskopických hub, např. rod *Cryptococcus* (16,17), který produkuje velmi nízké hladiny (1→3)-β-D-glukanu. Stanovení rovněž nedetekuje zygomycety, např. *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus* (16,17), o kterých není známo, že by produkovaly (1→3)-β-D-glukan. Stejně tak *Blastomyces dermatitidis* ve své kvasinkové formě produkuje málo (1→3)-β-D-glukanu a je proto obvykle nedetekovatelný (18).

### NEGATIVNÍ VÝSLEDEK

Hodnoty (1→3)-β-D-glukanu < 60 pg/mL jsou interpretovány jako negativní výsledek.

#### POZITIVNÍ VÝSLEDEK

Hodnoty >80 pg/mL jsou interpretovány jako pozitivní. Pozitivní výsledek znamená, že byl detekován glukan. To však neznamená, že musí jít o mykotické onemocnění. Konečná diagnóza musí být určena s ohledem na celkový klinický obraz pacienta.

#### NEURČITÝ VÝSLEDEK

Hodnoty naměřené v rozszeji od 60 do 79 pg/mL naznačují, že může pravděpodobně jít o houbovou infekci. V těchto případech je doporučeno provést kontrolní odběr. Pravidelné vyšetřování séra zvyšuje racionální využití testu pro primární diagnostiku.

#### KONTROLA KVALITY

- Korelační koeficient (r) lineární kalibrační křivky musí být větší než 0,980.
- Jamky s 25 µL.RGW jsou negativní kontroly. Naměřené hodnoty rychlosti změny absorbance (Vmean) negativních kontrol musí být nejméně o 50% nižší než naměřené hodnoty nejnižšího bodu kalibrační křivky. V opačném případě musí být stanovení zopakováno s novými činidly.
- Manipulace s problémovými vzorky. Jestliže laborant zjistí, že vzorky jsou zakalené, pochybně zbarvené nebo kalné (jako jsou např. silně hemolyzované a lipemické vzorky nebo vzorky obsahující nadměrné množství bilirubinu), musí takové vzorky naředít RGW a znovu otestovat. Výsledná koncentrace glukanu ve vzorku se vypočítá vynáobením naměřené hodnoty faktorem ředění. Faktor ředění je možné zadat do většiny programů hned na počátku experimentu a korekce ředění je pak provedena automaticky.
- Kontrolní vzorky (o diskriminačních a vysocepozitivních koncentracích) mohou být využity k ověření, že test a činidla fungují správně. Každý uživatel by si měl určit systém kontroly kvality pro zajištění jeho osobní způsobilosti provádět tento test.

#### OMEZENÍ TESTU

- Umístění houbové infekce ve tkáních (10), zapouzdření a množství (1→3)-β-D-glukanu produkovaného určitými plísněmi může ovlivnit sérovou koncentraci tohoto analytu. Snížená schopnost určitých hub produkovat (1→3)-β-D-glukan, který se podílí na celkové koncentraci glukanu v krevním řečišti, sniží jejich detekovatelnost. *Cryptococcus* spp. produkuje nízké hladiny (1→3)-β-D-glukanu (11) v důsledku zapouzdření buňky. O zygomycetách *Absidia*, *Mucor* spp. a *Rhizopus* spp. (16,17) není známo, že by produkovaly (1→3)-β-D-glukan (16,17). *Blastomyces dermatitidis* ve své kvasinkové fázi produkuje málo (1→3)-β-D-glukanu a výsledky testu jsou obvykle negativní (18).
- Některí jedinci mají zvýšenou koncentraci (1→3)-β-D-glukanu, která spadá do neurčité zóny. V takových případech je doporučeno provést další testy.
- Frekvence vyšetřování pacientů závisí na relativním riziku výskytu houbové infekce. U rizikových pacientů je doporučená frekvence odběru séra dvakrát až třikrát týdně.
- Pozitivní výsledky byly zjištěny u pacientů, kteří podstupují hemodialýzu (12,13), subjektů léčených určitými frakcionovanými krevními produkty, např. sérovým albuminem a imunoglobulin (19), a u vzorků nebo subjektů vystaveným záze obsahující glukan. Je nutno správně zvolit intervaly odběru krve k vyšetření po-operačních pacientů tak, aby se postihla skutečná koncentrace (1→3)-β-D-glukanu a ne jeho krátkodobý prudký nárůst v důsledku použití tamponů a zázy uvolňující glukan. Proto doporučujeme zahájit odběry nejdříve 3. nebo 4. den po operaci, kdy je bazální hladina glukanu v krvi již obnovena (6).
- Vzorky odebrané pomocí lancety z bříška prstu nebo z paty nejsou vhodné pro toto stanovení. Bylo prokázáno, že záza napuštěná alkoholem pro desinfekci místa vpichu (a pravděpodobně i kontakt krve s místem vpichu) kontaminuje vzorky při odběru.
- Hladiny koncentrací pro interpretaci tohoto testu byly stanoveny pro dospělé jedince. Normální hladiny u kojenců a dětí se blíží hladinám dospělých (21). Údaje pro novorozence a kojence mladší 6 měsíců nejsou k dispozici.
- Rozsah stanovení je od 31 pg/mL do 500 pg/mL. Hodnoty pod 31 pg/mL se uvádí jako < 31 pg/mL; hodnoty >500 pg/mL se uvádí jako > 500 pg/mL.

#### INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Níže uvedené vlastnosti vzorku mohou ovlivnit spolehlivost Fungitell testu:

- Hemolyzované serum
- Turbidní vzorek v důsledku lipémie
- Přítomnost okem viditelného bilirubinu
- Zakalené sérum

#### OČEKÁVANÉ HODNOTY

Hodnoty beta glukanu jsou zvýšené při různých houbových infekcích. U symptomatických subjektů nebo vysokorizikových skupin s hladinou glukanu 80 pg/mL a více je pozitivní predikční hodnota, že jde o houbovou infekci 74.4 a 91.7% (viz. tabulka 2). U asymptomatických pacientů s hladinou glukanu pod 60 pg/mL se negativní predikční hodnota pohybuje mezi 65.1 a 85.1%.

#### FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

##### Srovnávací studie

Funkční charakteristiky Fungitell testu byly vyhodnoceny v rámci prospektivní studie v několika testovacích centrech. Výsledky testu byly porovnány s dalšími typickými metodami pro detekci mykóz a fungemií (např. hemokulturov, histopatologickým vyšetřením bioptického vzorku a radiologických příznaků).

Tímto stanovením bylo testováno třista padesát devět (359) subjektů. Od každého subjektu byl získán jeden vzorek. V případě nízkorizikových subjektů šlo o zjevně zdravé jedince a pacienty, kteří byli hospitalizováni z jiných důvodů než houbové infekce. Nábor subjektů byl proveden v šesti zdravotnických zařízeních ve Spojených Státech, z nichž čtyři otestovala celkem 285 vzorků. ACC otestovala všech 359 vzorků dvakrát, ale použila pouze druhou sadu výsledků pro určení účinnosti stanovení. Výsledky druhé sady analýz se statisticky nelišily od první sady.

Senzitivita pro celou populaci subjektů (359) včetně *Cryptococcus* byla 65,0 % (interval spolehlivosti 60,1 – 70,0 % CI). Specifcita byla 81,1 % (77,1 – 85,2 % CI) (tabulka 1). Výsledky ze 4 testovacích míst měly senzitivitu v rozsahu od 50,0 % do 66,7 %. Specifcita se u 285 testovaných vzorků pohybovala od 70,0 % do 93,0 % (tabulka 2).

<b>Tabulka 1</b>	<b>Výsledky testů provedených v ACC pro diskriminační hladiny 60-80<span> </span>pg/mL (seřazeno podle lokality).</b>							
Lokalita	Prokázaná/pravděpodobná <b>Senzitivita</b> >=80pg/mL			Specifcita <60pg/mL			Celkem	
	Poz./klinický poz.	<b>Senzitivita</b>	Pozitivní predikční hodnota	Neg./klinický neč.	<b>Specifcita</b>	Negativní predikční hodnota		
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	N/A	0/0	N/A	0,0	0	1
Celkem*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

**\*Zahrnuje jeden vzorek z pracoviště 6.**

Senzitivita testu stanovená na základě porovnnání výsledků naměřených v ACC (a v ostatních zdravotnických zařízeních) s klinickou diagnózou je 64.3% (58.8% - 69.9% CI) pro ACC a 61.5% (55.9% -67.2%) pro ostatní laboratoře. Specifita je 86.6% (82.7% - 90.6%) pro ACC a 79.6% (74.9% - 84.3%) pro ostatní laboratoře (viz tabulka 2).

<b>Tabulka 2</b>	<b>Výsledky testů provedených v klinických zařízeních pro diskriminační hladiny 60-80<span> </span>pg/mL (seřazeno podle lokality).</b>							
Lokalita	Prokázaná/pravděpodobná <b>Senzitivita</b> >=80pg/mL			Specifcita <60pg/mL			Celkem	
	Poz./klinický poz.	<b>Senzitivita</b>	Pozitivní predikční hodnota	Neg./klinický neč.	<b>Specifcita</b>	Negativní predikční hodnota		
1	32/50	64,0	74,4	28/40	70,0	65,1	4	90
2	12/24	50,0	75,0	15/20	75,0	65,2	5	44
3 *								
4	22/33	66,7	91,7	40/43	93,0	85,1	5	76
5	22/36	61,1	78,6	30/39	76,9	75,0	7	75
6 *								
Celkem pracoviště	88/143	61,5	79,3	113/142	79,6	73,9	21	285
ACC	92/143	64,3	91,1	123/142	86,6	74,1	18	285

**\* Není testovacím pracovištěm**

#### KANDIDÓZA

V prospektivní studii bylo celkem zahrnuto 107 subjektů, u kterých byla diagnostikována kandidóza. 83 vzorků ze 107 vyšlo pozitivně Fungitell testem.

ACC obdržela 175 vzorků z knihovny kandidóz, z nich 145 bylo pozitivně identifikováno Fungitell testem.

#### ASPERGILÓZA

Celkem 10 subjektů bylo pozitivních na aspergilózu. 8 z 10 bylo pozitivních při tomto stanovení.

#### FUSARIÓZA

Tři subjekty byly pozitivní na fusariózu. 2 z 3 bylo pozitivních při tomto stanovení.

#### PROTIHOUBOVA TERAPIE

Protihoubová terapie neměla žádný statisticky významný vliv na senzitivitu stanovení. 118 subjektů s invazivním houbovým onemocněním se podrobilo protihoubové terapii. Z nich 82 bylo pozitivně určeno pomocí Fungitell testu (senzitivita, 69.5%; 61.2% - 77.8% CI). 24 subjektů s houbovým onemocněním se nepodrobilo protihoubové terapii. 18 z nich bylo identifikováno Fungitell testem (senzitivita, 75%; 57.7% - 92.3% CI).

#### SPECIFICITA

Celkem 170 subjektů bylo negativních na houbovou infekci a jednalo se o zjevně zdravé osoby. Specifcita u tohoto stanovení byla 86,5 % (82,8 % - 90,1 % CI). Po zahrnutí dalších 26 subjektů, kteří byli diagnostikováni s jiným než houbovým onemocněním, byla výsledná specifita 81,1 % (77,1 – 85,2 % CI).

#### KORELACE TESTU

Čtyři zdravotnická zařízení analyzovala celkem 285 vzorků. 96,4 % vysledků testu všech pracovišť kvantitavně korelovalo s výsledky ACC. Výsledky testů z jednotlivých pracovišť zvlášť korelovaly s ACC od 90.6 do 99.2%.

#### PŘESNOST

10 různých vzorků bylo testováno na třech testovacích pracovištích v rámci studie parametrů přesnosti, každé pracoviště v jiný den. Vnitřní analytická odchylka se pohybovala od 0.9% do 28.9%. Odchylka mezi jednotlivými analýzami dosáhla hodnot od 3.9 do 23.8%. Z obou analýz byly vyloučeny čtyři (4) negativní vzorky.

- Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002; 4 (Suppl. 3):32-37.
- 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 (24):1741-1751.
- Obayashi, et.al. Plasma (1,3)-beta-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 1995: 345:17-20.
- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2004) –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.
- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2005) A prospective pilot survey of B-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
- Ascioglu, et.al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. Clinical Infectious Diseases. 2002; 34:7-14.
- Iwanaga, S., Morita, T., Nakamura, T., and Aketagawa, J. (1986) The hemolymph coagulation system in invertebrate animals. J. Protein Chem 5: 255-268.
- Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., Tsunoda, Y. (1991) Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (1→3)-β-D-glucans. 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* ameboocyte 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 113:683-686.
- Kato, A. Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. (2001) Elevation of blood (1→3)-Beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
- 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.

- 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.
- 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 measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet 345: 17-20.
- 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.
- Mitsuya, M., Wada, K. and Yamaguchi, H. (1994) In vitro studies on the release of G Test-positive (1→3)-β-D-glucans from various fungal pathogens. In Committee on Organic Dusts, ICOH, Report 1/94, Rylander, R. and Goto, H. editors. pp 29-37.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

#### DALŠÍ NEUVÁDĚNÁ LITERATURA

- Obayashi, T., Yoshida, M., Tamura, H., (1→3)-β-D-glucans Aketagawa, J., Tanaka, S., and Kawai, T. (1992) Determination of plasma (1→3)-β-D-glucan: A new diagnostic aid to deep mycosis. J. Medical and Vet. Mycol. 30: 275-280.
- 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. Clinica Chimica Acta 226: 109-112.
- Yasuoka, A., Tachikawa, N., Shimada, K., Kimura, S., and Oka, S. (1996) (1→3)-β-D-glucan as a quantitative serological marker for Pneumocystis carinii pneumonia. Clinical and Diagnostic. Lab. Immuno. 3: 197-199.
- Yoshida, M., Obayashi, T., Iwama, A., Ito, M., Tsunoda, S., Suzuki, T., Muroi, K. Ohta, M., Sakamoto, S., and Miura, Y. (1997) Detection of plasma (1→3)-β-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* Fungaemias. J. Med. Vet. Mycology 35:371-374.
- Yuasa, K., Goto, H., Iguchi, M., Okamura, T., and Ieki, R. (1996) Evaluation of the diagnostic value of the measurement of (1→3)-β-D-glucan in patients with pulmonary aspergillosis. Respiration 63: 78-83.

#### POPIS SYMBOLŮ

<span><span>☒</span></span>	<b>„Použitelné do“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„Lze použít pro ‘n’ testů“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„Kód šarže“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„In vitro diagnostický zdravotnický prostředek“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„Katalogové č.“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„Teplotní rozmezí“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„Výrobce“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„Viz návod k použití“</b>
<span><span>☒</span></span>	<b>„Autorizovaný zástupce“</b>

**☒** **☒** **„CE značka“**

<span><span>☒</span></span>	<span><span>☒</span></span>	<b>Associates of Cape Cod® International, Inc.</b> Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Velká Británie
-----------------------------	-----------------------------	--