

Teszt (1→3)-β-D-Glükán szérumból történő kimutatásához

FUNGITELL®

Használati utasítás



**ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED**

124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Telefon: +1 508 540-3444
Zöld szám: +1 888 395-2221
Fax: +1 508 540-8680
Technikai segélyszolgálat: +1 800 848-3248
Vevőszolgálat: +1 800 525-8378



42



PNO01268-hu-1. rev. Átdolgozás dátuma: 2011. február

JAVASOLT FELHASZNÁLÁS

A Fungitell egy proteáz zimogén alapú kolorimetriás teszt az (1→3)-β-D-Glükán kvalitatív kimutatására invazív gombás fertőzés tüneteit mutató, illetve invazív gombafertőzésre hajlamosító állapottal rendelkező betegek szérumból. A különböző orvosiilag fontos gombák (1) fő sejtfal alkotórése, az (1→3)-β-D-Glükán szérumkoncentrációjának meghatározása segíthet a mérlegen elhelyezkedő mikózisok és fungémiák diagnózisában (2). A pozitív eredmény nem jelzi, hogy melyik osztályba tartozó gomba okozhatja a fertőzést.

A teszt egyéb diagnosztikai eljárásokkal, például mikrobiológiai tenyésztéssel, a biopsziás minták szövettani vizsgálatával és radiológiai vizsgálattal együtt alkalmazandó.

<p>Fontos - Javasolt a következő információkat a vizsgálatot kérő orvos számára továbbadni:</p> <p>A Fungitell teszt nem mutat ki bizonyos gombafajokat, például a <i>Cryptococcus</i> genust, amelyek az (1→3)-β-D-Glükánt csak nagyon alacsony koncentrációban termelik (3,4). A teszt nem mutatja ki továbbá a Zygomyceset, például az <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> és <i>Rhizopus</i> (1,4) fajokat, amelyekről ismert, hogy nem termelnek (1→3)-β-D-Glükánt. Ezen kívül a <i>Blastomyces dermatitidis</i> az élesztőgomba fázisában kevés (1→3)-β-D-Glükánt termel, amit a teszt esetleg nem mutat ki (5).</p> <p>Ezeket az információkat a glükán-teszt eredményeit ismertető leleteken fel kell tüntetni.</p>
--

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MAGYARÁZAT

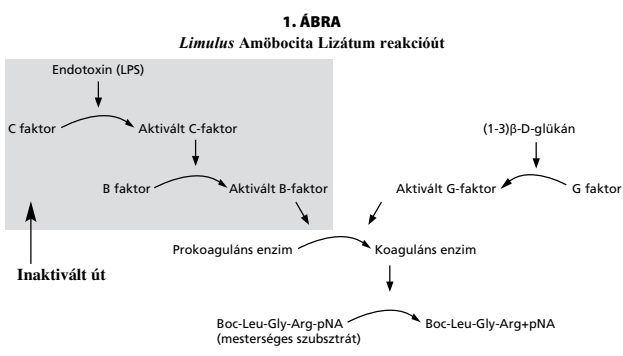
Az opportunista kórokozók által okozott gombás fertőzések előfordulási gyakorisága egyaránt növekszik, különösen immunkompromittált betegek körében (6,7,8). Az invazív gombás betegségek opportunista fertőzések formájában gyakoriak malignus hematológiai megbetegedésekben és AIDS-ben szenvedő betegek között, és egyre több nozokomiális fertőzést okoznak, különösen szervtranszplantáltak, valamint immunszuppresszív kezelésben részesülő egyéb betegek között (9,10). Sok gombás betegséget a földből, növényi törmelékekből, a légkeringető rendszerekből és/vagy kontaminált felületekről származó spórák beelégzése okoz. Néhány opportunista gombafaj jelen van az emberi bőrben/bőrön, a tápcsatornában és a nyálkahártyákon (11,12). Az invazív mikózisok és fungémiák diagnózisa általában nem specifikus diagnosztikai vagy radiológiai technikán alapul. A gombafertőzések biológiai markereit mostanában hozzáadták a rendelkezésre álló diagnosztikai módszerekhez (2).

Opportunista patogén gombák a *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schencki* és a *Pneumocystis carinii*. A fentebb említett és egyéb mikroorganizmusok által termelt (1→3)-β-D-Glükán kimutatható a Fungitell teszttel (1,8,13).

AZ ELJÁRÁS ELVE

A Fungitell teszt az (1→3)-β-D-Glükán koncentrációját méri. A teszt az 1. ábrán bemutatott *Limulus* Amöbocita Lizátum (LAL) reakciót (14,15,16,17) módosításn alapul. A Fungitell reagenst módosították a C-faktor eliminálása érdekében, így az a reakciót G-faktor által mediált oldalán keresztül csak az (1→3)-β-D-Glükánnal reagál.

Az (1→3)-β-D-Glükán aktíválja a G-faktort, ami egy szerin-protáz zimogén. Az aktivált G-faktor alakítja át az inaktív prokoaguláns enzimet aktív koaguláns enzimmé, ami pedig lehasítja a pNA-t a Boc-Leu-Gly-Arg-pNA kromogén peptid szubsztrátról, létrehozva egy olyan kromofór vegyületet, amely 405 nm-es hullámhosszon abszorbeál. Az alább ismertetett Fungitell kinetikus teszt a mintában észlelhető optikai denziás növekedési sebességének meghatározásán alapul. Ezt a sebességet egy törzsből vétele összehasonlítva kell kiértékelni, így megkapjuk a minta becslült (1→3)-β-D-Glükán koncentrációját.



A FUNGITELL KITBEN SZÁLLÍTOTT ANYAGOK

A Fungitell kit *in vitro* diagnosztikai alkalmazásra szolgál. Mindegyik kitben megtalálhatók a következő anyagok, amelyek két mikrotiter lemez 110 cellájának vizsgálatához elegendőek (55 cella mindegyik lemezen):

- Fungitell® reagens, liofilizált, (1→3)-β-D-Glükán specifikus LAL (két üveg).
- Pyrosol® oldópuffer, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (két üveg). Külön beszerezhető további üveg Pyrosol oldópuffer (katalógusszám: BC051).
- Glükán standard, liofilizált pachyman és inert töltőanyag, melynek címkéjén szerepel az (1→3)-β-D-Glükán koncentrációja (két üveg)
- Reagens minőségű víz (két üveg)
- Pyroplate lemezek: Lapos aljú, 96 cellás, nem bevont, fedekekkel rendelkező és a vizsgálatot zavaró glükánoktól mentes mikrotiter lemezek (kettő)
- KCl 1,2 M (egy üveg)
- KOH 0,25 M (egy üveg)

A standard oldat kivételével a fentebb felsorolt reagensek egyike sem tartalmaz a vizsgálatot zavaró mennyiségű (1→3)-β-D-Glükánt.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

Egyik anyag sem tartalmazhat zavaró mennyiségben glükánt. Az üvegedényeket száraz hővel minimum 235°C-on 7 órán át (vagy ezzel egyenértékű hitelesített eljárással) kell pirogémmentesíteni ahhoz, hogy a használatra alkalmasak legyenek.

- Pipetta hegyek* (250 µl - Cat# PPT25, 1000 µl - Cat# PPT10)
- 5-25 µl és 100-1000 µl térfogatok adagolására alkalmas pipettorok
- Ismétlő adagoló pipettor fecskendőhegyekkel, 100 µl adagolására alkalmas
- Kémesövek* standard hígítási sor elkészítéséhez és a szérum kezelésére szolgáló reagensek összekeveréséhez. (13 x 100 mm-es boroszilikát üveg - Cat# TB013)
- Kétféle, 405 és 490 nm-es hullámhosszon mérni képes, inkubálási funkcióval (37°C) rendelkező fotométer, legalább 2,0 abszorbancia egységig terjedő dinamikus tartománnyal és megfelelő számítógépes alapú kinetika-elemző szoftverrel összekapcsolva.
- Steril, glükánmentes, csavaros tetejű tárolócsövek a minták több részre történő szétosztásához (a leg több bevizsgált, és igazoltan RN-áz, DN-áz és pirogénmentes cső nem tartalmaz zavaró koncentrációban (1→3)-β-D-Glükánt).
- Parafilm®

*Ezek az Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) cég által szállított termékek igazoltan nem tartalmaznak zavaró mennyiségű glükánokat.

Vigyázat! A papírvatta dugóval ellátott üvegpipetták a glükán szennyeződés lehetséges forrásaí.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÖVINTÉZKEDÉSEK
Ez a termék IN VITRO DIAGNOSZTIKUM.

<p>A Fungitell teszt elvégzéséhez az eljárásra és a vizsgálati környezetre vonatkozó előírásokat szigorúan be kell tartani. A teszt sikerességéhez kulcsfontosságú követelmény a tesztet végző asszisztens alapos képzettsége és a szennyeződés elkerülése.</p>

- Bizonyos gombafajok nagyon alacsony koncentrációban termelnek (1→3)-β-D-Glükánt, és általában nem mutathatók ki a Fungitell teszttel. Ilyen például a *Cryptococcus* genus (3,4), valamint a zygomyceták, úgymint az *Absidia*, a *Mucor* és a *Rhizopus* (1,4). Ezen kívül a *Blastomyces dermatitidis* élesztőgomba formájában kis koncentrációban termeli az (1→3)-β-D-Glükánt, ezért a Fungitell teszt általában nem mutatja ki (5).
- Egyik anyagot se pipettázsa szájjal! Abban a helységben, ahol a mintákat és a kit reagenseit kezeli, mellőzze a dohányzást, az evést és az ivást!
- Tiszta környezetben végezze a tesztet! Olyan anyagokat és reagenseket használjon, amelyek igazoltan mentesek az (1→3)-β-D-Glükán zavaró mennyiségétől. Tartsa szem előtt, hogy az emberi testről, ruhákról, tartályokból, vízből és lebegő porból származó glükán és gombás szennyeződések inerferálhatnak a Fungitell teszttel.
- Ne használjon lejárt szavatosságú reagenseket!
- Az elszíneződött vagy zavaros oldatok, például amelyek nagymértékben hemolizáltak, lipémiások vagy nagy mennyiségű bilirubint tartalmaznak, zavarhatják a reakciót. Ha ilyen mintákat vizsgál, akkor ellenőrizni kell a teszteredményeket, és meg kell állapítani, hogy van-e optikai interferenciára utaló jel, és/vagy észlelhető-e szokatlan kinetika.

- Használjon megfelelő védőruházatot és hintőpormentes kesztyűt a betegek mintáival való munka közben.
- Hemodializált betegek széruma nagy koncentrációban tartalmazhat (1→3)-β-D-Glükánt, amennyiben bizonyos típusú cellulóz dializáló membrán alkalmaztak a dialízis során (18,19). Úgy tűnik, hogy a cellulóz-triacetát vagy polimetil-metakrilát membránnal végzett hemodialízis nem befolyásolja a tesztet.
- A sebészi géz és szivacs nagy koncentrációban bocsáthat ki (1→3)-β-D-Glükánt, ami közrejátszhat a Fungitell teszttel szennyeződés miatt kapott átmeneti pozitív eredményhez, amint azt sebészeti beavatkozáson átesett betegek esetében megfigyelték (20,21).
- Sérült tartalmú kitet ne használjon fel!
- Azokat az anyagokat, amelyek potenciálisan szennyezett (patogén tartalmú) folyadékkal érintkeztek, a helyi jogszabályoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

A reagensek tárolása

Valamennyi reagens eredeti csomagolásában tárolandó 2-8°C-os hőmérsékleten, sötét helyen. Az elkészített Fungitell reagens 2-8°C között tárolandó, és két órán belül fel kell használni. Az elkészített Fungitell reagens le is fagyasztható -20°C-on, legfeljebb 20 napra, majd egyetlen alkalommal felolvasztható és felhasználandó.

A minta kezelése

- Mintavétel: A szérum mintákat steril vákuumos vérvételi csőbe (piros tető) vagy szérum szeparátor csőbe (SST) kell levenni, és hagyni kell megalvadni. A szérumot ezután el kell választani az alvadéktól, és le kell öntení egy megfelelő tartályba, amely nem tartalmaz (1→3)-β-D-Glükánt zavaró koncentrációban.
- A minta tárolása: A szérum minták a teszt elvégzése előtt 2-8°C-on tárolhatók illetve -20°C-os vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten lefagyaszthatók. A vizsgálatot azonnal el kell végezni a minta bomlását elkerülendő.
- A minta címkézése: A mintákat egyértelműen kell felcímkézni az intézményben jóváhagyott gyakorlat szerint.

AZ ELJÁRÁS

Megjegyzés: A beállítások a különböző eszközök és szoftverek esetében eltérőek lehetnek. Általában a következők szerint kell eljárni: Állítsa be a fotométer szoftvert V mean módban történő adatgyűjtéshez. Nézzon utána a szoftver kézikönyvében, hogy milyen beállításokat kell alkalmazni annak biztosítása érdekében, hogy a kiszámított érték az összes felvett adatpontra vonatkozó optikai denzitás-változás átlagos sebessége legyen. A készülék egyes leolvásai között eltelt be kell állítani a szoftver és a készülék által megengedett minimálisra a 40 perces tesztidőszak alatt. A szoftverben a hullámhossz értéket a 405 nm-en valamint a 490 nm-en mérhető háttérdenzitás különbségének meghatározásához kell beállítani. Ha a kétféle hullámhosszon történő leolvasás nem lehetséges, akkor a mérést 405 nm-en kell elvégezni. Az inkubálási hőmérsékletet 37°C-ra kell beállítani. A mikrotiter lemezt 5-10 másodpercig kell rázatni a leolvasás megkezdése előtt. A görbe illesztésének beállításra legyen „lineáris/lineáris” vagy ezzel egyenértékű. A leolvasást késedelem nélkül meg kell kezdeni.

- A kitben található glükán standard oldat elkészítése.
 - Oldjon fel egy üveg glükán standard oldatot az üvegen feltüntetett térfogatú laboratóriumi tisztaságú vízzel, hogy 100 pg/ml koncentrációjú oldatot kapjon. Az oldat reszuspéndálásához keverje legalább 30 másodpercig Vortex-keverővel (1. számú oldat). A glükán oldat 2-8°C közötti hőmérsékleten tárolandó, és három napon belül fel kell használni. Az alábbi b-e lépések mutatják be egy standard görbe felvételének eljárását.
 - Készítsen 50 pg/ml koncentrációjú standard oldatot 500 µl laboratóriumi tisztaságú víz és 500 µl 1. számú oldat glükánmentes csőben történő összekeverésével (2. számú oldat). Vortexszel keverje legalább 10 másodpercen át.
 - Készítsen 25 pg/ml koncentrációjú standard oldatot 500 µl laboratóriumi tisztaságú víz és 500 µl 2. számú oldat glükánmentes csőben történő összekeverésével (3. számú oldat). Keverje vortexszel legalább 10 másodpercen át.
 - Készítsen 12,5 pg/ml koncentrációjú standard oldatot 500 µl laboratóriumi tisztaságú víz és 500 µl 3. számú oldat glükánmentes csőben történő összekeverésével (4. számú oldat). Keverje vortexszel legalább 10 másodpercen át.
 - Készítsen 6,25 pg/ml koncentrációjú standard oldatot 500 µl laboratóriumi tisztaságú víz és 500 µl 4. számú oldat glükánmentes csőben történő összekeverésével (5. számú oldat). Keverje vortexszel legalább 10 másodpercen át.
- A szérum-előkezelő reagens elkészítése. A lügos szérum-előkezelő reagens a tripla-hélix szerkezetű glükánokat egyszerű glükánokká alakítja (16,17), amelyek reakcióképesebbek a teszt során. A magas pH-érték egyúttal inaktíválja a szérumban található szerin-protéázokat illetve szerin-protézis inhibitorokat, amelyek a teszt álpozitív, illetőleg álnegatív eredményét okozhatják (22).
 - A szérum-előkezelő reagens elkészítéséhez keverjen össze egyenlő térfogatú 0,25 M-os KOH-ot és 1,2 M-os KCl-ot, és vortexszel keverje össze. A reagensek ajánlott mennyisége mindegyik reagens esetében legfeljebb 900 µl, ami két mikrotiter lemezhez elegendő. Az üvegeket a második mikrotiter lemez használatáig le kell fedni Parafilmmel. Az üveget a Parafilmnek azt a felével fedje le, amely a piparral érintkezett.

- Megjegyzés: A standard görbe felvételekora a standard oldatok koncentrációját meg kell szorozni ottal, hogy az 500-31 pg/ml-es koncentrációtartományba essenek. Adja meg a standard oldatok értékeit a szoftverben az 500, 250, 125, 62,5 és 31 pg/ml koncentrációkra vonatkozóan.

A teszt során a standard oldat térfogata 25 µl cellánként, vagy a szérum minta térfogatának ötszöröse. A mikrotiter lemez összeállítása a standardokkal (St), a negatív kontrollokkal (Neg) és a 21 ismeretlen (Uk) oldattal, mindegyikből két példányt vizsgálva, a következőképpen történik:

	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												

- megjegyzés: A külső cellák is használhatók, ha bizonyított, hogy azok teljesítménye hasonló a belső cellákéhoz.
- megjegyzés: A véletlen szennyeződés elkerülése érdekében a minták és a reagensek cellákba adagolása után vissza kell helyezni a mikrotiter lemezre a fedelét. Mielőtt a mikrotiter lemezt behelyezné a fotométerbe, a fedelét le kell venni a páralecsapódás okozta optikai interferencia elkerülése érdekében.

- A szérum és az előkezelő reagens hozzáadása.
 - A fagyaszott szérum mintákat szobahőmérsékleten fel kell olvasztani. Az összes mintát jól keverje össze vortexszel.
 - Adagoljon a szérum mintából 5µl-t valamennyi kijelölt cellába (Uk), legalább két példányban. Ismétlje meg a fenti műveletet az összes szérum mintával.
 - Minden szérumot tartalmazó cellába adagoljon 20 µl szérum-előkezelő reagenst.
 - Megjegyzés: A „b” és a „c” lépést az asszisztens tetszés szerint felcserélheti.
 - Rázassa a mikrotiter lemezt 5 – 10 másodpercig, hogy a cellák tartalma jól összekeveredjen (erre a célra használható a fotométer rázató funkciója), majd inkubálja 10 percig 37°C-on az inkubátorral rendelkező fotométerben.
- A Fungitell reagens feloldása. Megjegyzés: Ez a művelet kényelmesen elvégezhető, az előkezeléshez szükséges inkubálás alatt.
 - Oldjon fel egy ampulla Fungitell reagenst 2,8 ml laboratóriumi tisztaságú vízzel, majd adjon hozzá 2,8 ml Pyrosol oldópuffert az 1000µl-es pipettor használatával. Fedje le az üveget Parafilmmel, a Parafilm papír felőli oldalát használva. Óvatosan forgassa körkörös en az üveget, hogy teljesen feloldódjon az anyag – ne keverje vortexszel.
- A negatív kontrollok és a glükán standardok hozzáadása. A szérum előkezelési eljárását képező inkubálási periódus végén (3.d lépés) távolítsa el a mikrotiter lemezt a fotométer inkubátorából, és adagolja a standard oldatokat illetve a negatív kontrollokat a mikrotiter lemez celláiba.
 - A G2-es és a G3-as cellába adagoljon 25 µl laboratóriumi tisztaságú vizet.
 - A F2-es és az F3-as cellákba adagoljon 25 µl-t a 6,25 pg/ml koncentrációjú 5. számú standard oldatból.
 - Az E2-es és az E3-as cellába adagoljon 25 µl-t a 12,5 pg/ml koncentrációjú 4. számú standard oldatból.
 - A D2-es és a D3-as cellába adagoljon 25 µl-t a 25 pg/ml koncentrációjú 3. számú standard oldatból.
 - A C2-es és a C3-as cellába adagoljon 25 µl-t az 50 pg/ml koncentrációjú 2. számú standard oldatból.
 - A B2-es és a B3-as cellába adagoljon 25 µl-t a 100 pg/ml koncentrációjú 1. számú standard oldatból.
- A Fungitell reagens hozzáadása és a mikrotiter lemez inkubálása.
 - Mindegyik (negatív kontrollokat, standard oldatokat és mintákat tartalmazó) cellába adagoljon 100 µl Fungitell reagenst az ismétlő adagolás pipettor segítségével.
 - Behelyezze be a lefedett mikrotiter lemezt a fotométerbe (miután beállt a hőegyenlőség 37°C-on), majd rázassa 5-10 másodpercig. Olvassa le az eredményeket a fedél eltávolítása után, és határozza meg a 405 nm és a 490 nm hullámhosszon kapott optikai denzitás különbséget 40 percen át 37°C-on. Amennyiben a háttér levonása (490 nm-en) nem lehetséges, elfogadható, ha 405 nm-en olvassa le az értékeket. Ha a fotométernek nincsen mikrotiter lemez rázatósi funkciója, akkor a mikrotiter lemez rázatószámú külső eszköz használható.
 - Vegye fel az adatokat, majd elemezze a következők szerint: Vizsgálja meg a tesztminták optikai-denzitás pontokat, és ellenőrizze a kinetikai nyommintákat, melyek nem lágyan növekednek a standardhoz képest. Érvénytelenítse az optikai interferenciát jelző pontokat. Számítsa ki az optikai denzitás-változás átlagos sebességét (milli-abszorbancia egység/perc) minden pontra 0 és 40 perc között.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A Fungitell teszt eredményei segédeszközként használhatók az invazív gombás fertőzések diagnosztikájában. Az eredmények kifejezése pg/szérum ml mértekegységben, a nem kimutathatótól (<31 pg/ml) a > 500 pg/ml-ig terjedő tartományban történik. Az eredmények kinyomathatók a szoftverrel, vagy leolvashatók a standard görbéről. 500 pg/ml-nél magasabb

eredmény esetén a pontos érték meghatározása érdekében a mintát laboratóriumi tisztaságú vízzel hígítani kell, majd újra kell vizsgálni.

A vizsgálatot végző laboratóriumnak tájékoztatnia kell a vizsgálatot kérő orvost arról, hogy a Fungitell teszt nem mutat ki bizonyos - nagyon kevés (1→3)-β-D-Glükánt termelő - gombafajokat, például a *Cryptococcus* genust (3,4). A teszt szinten nem mutatja ki a *zgomycetákat*, például az *Absidia*, a *Mucor* és a *Rhizopus* (1,4) fajokat, amelyekről ismert, hogy nem termelnek (1→3)-β-D-Glükánt. A *Blastomyces dermatitidis* élesztőgomba formájában úgyszintén kevés (1→3)-β-D-Glükánt termel, ezért általában nem mutathatók ki (5).

NEGATÍV EREDMÉNY

A 60 pg/ml alatti (1→3)-β-D-Glükán értéket negatív eredményként értékeljük.

POZITÍV EREDMÉNY

A ≥ 80 pg/ml feletti értékek pozitív eredményt jelentenek. A pozitív eredmény azt jelenti, hogy az (1→3)-β-D-Glükán kimutatható a mintában. A pozitív eredmény nem jelenti betegség fennállását, és diagnózis felállításához a további klinikai leletekkel együtt kell értékelni.

KÉTES EREDMÉNY

A 60-79 pg/ml közötti értékek lehetséges gombás fertőzésre utalnak. Ilyen esetekben újabb mintavétel, és a szérum ismételt vizsgálata javasolt. A gyakori mintavétel és tesztelés fokozza a vizsgálat diagnosztikai értékét.

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- A standard görbe korrelációs együtthatójának (r) (lineáris vs. lineáris) meg kell haladnia a 0,980-es értéket.
- A (25 µl laboratóriumi tisztaságú vizet) tartalmazó cellák a negatív kontrollok. A negatív kontrollok esetében az optikai denzitás-változás (Vmean) sebességének a legkisebb koncentrációjú standard oldat értékének 50%-ánál kevesebbnek kell lennie. Ha ez nem így van, akkor a tesztet meg kell ismételni mindegyik reagensből újat használva.
- A problémás minták kezelése. Ha a vizsgálatot végző személy felhős, elszíneződött vagy zavaros, például nagymértékben hemolizált, lipémis vagy nagy mennyiségű bilirubint tartalmazó, szokatlan optikai-denzitás kinetikájú mintákkal találkozik, akkor ezeket laboratóriumi tisztaságú vízzel fel kell hígítani, és vizsgálatukat meg kell ismételni. A hígítást az eredmények letelezése során számításba kell venni, megszorozva az eredményt a hígítási tényezővel. A mintára vonatkozó hígítási tényezőt általában a szofiverbe kell bevinni, amely automatikusan elvégzi az eredmények korrigálását.
- A reagensk és a teszt megfelelő működésének ellenőrzése érdekében vizsgálhatók kontroll minták, határértéken lévő koncentrációjú, valamint erősen pozitív minták. A teszt valamennyi felhasználójának be kell vezetnie egy minőségellenőrzési programot a teszt elvégzésében való szakmai jártasság biztosítása érdekében.

A TESZT KORLÁTAI

- A gombás fertőzés szöveti lokalizációja (10), a tokképződés és a bizonyos gombák által termelt (1→3)-β-D-Glükán mennyisége befolyásolhatja az analíz szérumkoncentrációját. Ha a gomba csak kisebb mértékben képes (1→3)-β-D-Glükánt leadni a véráramba, akkor ez csökkenteti az adott gombás fertőzés kimutathatóságát. A *Cryptococcus spp.* speciek csak kis koncentrációban termelnek (1→3)-β-D-Glükánt. (3,4). A *Zygomyceták*, például az *Absidia spp.*, a *Mucor spp.* és a *Rhizopus spp.* fajok ismerten nem termelnek (1→3)-β-D-Glükánt (1,4). A *Blastomyces dermatitidis* élesztőgomba formájában kevés (1→3)-β-D-Glükánt termel, így a teszt eredménye általában negatív (5).
- Bizonyos egyéneknek emelkedett az (1→3)-β-D-Glükán szintjük, és a kétes tartományba esik. Ilyen esetekben további vizsgálatok javasoltak.
- A beteg vizsgálatának gyakorisága a gombás fertőzés relatív kockázatától függ. A kockázatnak kitett betegek esetében hetente legalább kétszer-háromszor javasolt mintavétel.
- Pozitív eredményeket észleltek hemodializált betegek esetében (18,19), bizonyos frakcionált vérkészítményekkel, például szérum albuminnal és immunglobulinokkal (23) kezelt betegeknél, valamint glükán tartalmú gézzel érintkezett minták illetve betegek esetében. Ha a beteg sebési okból kifolyólag (1→3)-β-D-Glükánt tartalmazó törlővel vagy gézzel érintkezett, akkor 3-4 nap szükséges ahhoz, hogy a szérumban visszaálljon a (1→3)-β-D-Glükán kiindulási koncentrációja (20,21). Ennek megfelelően ezt figyelembe kell venni a sebési beavatkozáson átesett betegek mintavételének időzítése szempontjából.
- A sarok vagy az ujjbegy megszurásával vett minták nem fogadhatók el, mert az alkoholba áztatott gézről, amivel a mintavétel helyét (és esetleg azt a bőrfelületet, ahol meggyűlik a vér) előkészítik, kimutatták, hogy szennyezi a mintákat.
- A teszttel kapott koncentrációkat felhőt alanyonk határozhatk meg. A csecsemőkre és gyermekekre vonatkozó normál koncentrációk közel állnak a felnőttekéhez (24). Újszülöttekről és hat hónappál fiatalabb csecsemőkről nincs adat.
- A teszttel kapott eredmények leletezhető tartománya 31 pg/ml és 500 pg/ml között van. A 31 pg/ml-nél alacsonyabb értékek < 31 pg/ml formában szerepelnek a leletben, míg az 500 pg/ml-nél magasabb értékek > 500 pg/ml formában, hacsak nem hígítják fel a mintát.

ZAVARÓ ANYAGOK

A Fungitell teszttel kapott eredmények pontosságát a minta alábbi állapotai befolyásolhatják:

- Hemolízis
- A minta lipaemia okozta turbiditása
- Szabad szemmel látható bilirubin jelenléte
- Zavaros szérum

VÁRT ÉRTEKEK

A béta-glükán értékek számos gombás fertőzésben emelkedtek. Ha 80 pg/ml vagy magasabb koncentráció mellett a beteg tüneteket mutat, akkor a gombás fertőzés fennállására vonatkozó prediktív érték a 74,4-91,7% közötti tartományban van (2. táblázat). 60 pg/ml érték alatt tünetek hiányában a negatív prediktív érték a 65,1-85,1% közötti tartományban van.

A TELJESÍTMÉNYRE VONATKOZÓ JELLEMZŐK
Összehasonlító vizsgálat
Elvégezték egy multicentrikus, prospektív vizsgálatot a Fungitell teszt teljesítmény-jellemzőinek validálására (25). A tesztet összehasonlították más, a mikózisok és fungémiák kimutatására alkalmazott standard módszerekkel (vagyis hemokultúra, a biopsziás minta kórszövetviani vizsgálata és radiológiai jelek).

A tesztel háromszázötvenkilenc (359) beteget vizgáltak. Mindegyik betegtl egy mintát vettek. A kis kockázatú csoportba a látszólag egészséges, valamint a klinikai vizsgálóhelyekre nem gombás fertőzés miatt felvett egyének tartoztak. A vizsgálati alanyok toborzását az Egyesült Államokban található hat vizsgálóhelyen végezték. A klinikai vizsgálóhelyek közül négyben összesen 285 mintán végezték el a tesztet. Az ACC az összes 359 mintát kétszer vizsgálta, de a második vizsgálati eredményt csak a teszt teljesítményének meghatározására használták. A másodsorra végezt elvégzett elemzése eredményei az első elemzések eredményeinek csoportjától statisztikailag eltérő nem mutatnak.

A teljes vizsgálati populációra (359) vonatkozó szenzitivitás (a *Cryptococcus* specieseket is beleértve) 65,0% volt (60,1 - 70,0%-os konfidencia-intervallum - KI). A specifikitás 81,1% volt (77,1 - 85,2 %-os KI) (1. táblázat). A négy vizsgálóhelyről származó eredmények szenzitivitásának tartománya az 50,0% - 66,7%-os tartományban mozgott. A specifikitás a 285 vizsgált mintára vonatkozóan a 70-0%-93,0%-os tartományban mozgott (2. táblázat).

1. táblázat	Az ACC teszteredményei vizsgálóhelyekre lebontva, 60-80 pg/ml-es határérték alkalmazásával								
Vizsgálóhely	Bizonyított/valószínű Szenzitivitás ≥80pg/ml			Specifikitás <60pg/ml			Kétes 60<=>X<80	Összesen	
	Poz/Klin. poz.	Szenzitivitás	Pozitív prediktív érték	Neg/Klin. neg.	Specifikitás	Negatív prediktív érték			
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	
Összesen*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359	

***A 6. számú vizsgálóhelyről egy mintát tartalmaz.**
Amennyiben az ACC (359 minta) és a klinikai vizsgálóhelyek (285 minta) által kapott eredményeket összevetjük a klinikai diagnózissal, a szenzitivitás 64,3% (KI: 58,8% - 69,9%) az ACC és 61,5% (KI: 55,9% - 67,2%) a vizsgálóhelyek esetében. Az ACC-re vonatkozó specifikitás 86,6% (KI: 82,7% - 90,6%), szemben a vizsgálóhelyek 79,6%-os (KI: 74,9% - 84,3%) specifikításával (2. táblázat).

2. táblázat	A vizsgálóhelyek eredményei 60-80 pg/ml-es határérték alkalmazásával, vizsgálóhelyenként lebontva								
Vizsgálóhely	Bizonyított/valószínű Szenzitivitás ≥80pg/ml			Specifikitás <60pg/ml			Kétes 60<=>X<80	Összesen	
	Poz/Klin. poz.	Szenzitivitás	Pozitív prediktív érték	Neg/Klin. neg.	Specifikitás	Negatív prediktív érték			
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 *									
Összesen, vizsgálóhelyek	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	

*** Nem vizsgálóhely**

CANDIDIASIS

A prospektív vizsgálat során 107 betegnél állították fel a candidiasis diagnózisát. A 107 beteg közül 83 volt pozitív a Fungitell teszttel.

Százhetvenöt candidiasisra pozitív gyűjtemény-mintát szállítottak az Associates of Cape Cod céghez. A 175 minta közül 145 bizonyult pozitívvnak a teszttel.

ASPERGILLOSIS

Összesen 10 vizsgálati alany volt pozitív aspergillosisra. A 10 alany közül 8 bizonyult pozitívvnak a teszttel.

FUSARIOSIS

Három vizsgálati alany volt pozitív fusariosisra. A 3 vizsgálati alany közül 2 bizonyult pozitívvnak a teszttel.

ANTIFUNGÁLIS GYÓGYSZERES TERÁPIA

Nem gyakorolt statisztikailag szignifikáns hatást a teszt szenzitivitására, hogy a beteg részesül-e antifungális gyógyszeres terápiában. 118 antifungális terápiában részesülő vizsgálati alany bizonyult pozitívnak az invazív gombás fertőzés fennállására vonatkozóan. 82-nél mutatót pozitív eredményt a teszt (szenzitivitás: 69,5%; KI: 61,2% - 77,8%). Rajtuk kívül huszonegy (24) olyan vizsgálati alany bizonyult pozitívvnak, akik nem részesültek antifungális kezelésben. 18-nál mutatót pozitív eredményt a teszt (szenzitivitás: 75%; KI: 57,7% - 92,3%).

SPECIFITÁSI

A látszólag egészséges egyének közül összesen 170 vizsgálati alany volt negatív a gombafertőzésre vonatkozóan. A specifikitás a teszttel 86,5% volt (KI: 82,8% - 90,1%). Ha hozzávesszük azt a további 26 vizsgálati alanyt, akik negatívak voltak a gombafertőzésre, de egyéb betegségük volt, akkor a specifikitás 81,1%-nak adódik (KI: 77,1% - 85,2%).

KORRELÁCIÓ A TESZTEREDMÉNYEK KÖZÖTT

A klinikai vizsgálóhelyek közül négyben összesen 285 mintán végezték el a tesztet. A vizsgálóhelyek által kapott teszteredmények és az Associates of Cape Cod által kapott teszteredmények kvantitatív korrelációja 96,4% volt. Az Associates of Cape Cod és a különböző vizsgálóhelyek által kapott teszteredmények korrelációja a 90,6 - 99,2%-os tartományban mozgott.

PONTOSSÁG

A pontosság meghatározására irányuló vizsgálatok során tíz (10) különböző mintát vizsgáltak egyenként három különböző vizsgálóhelyen, három különböző napon. Az intra-assay változékonyság a 0,9 - 28,9%-os tartományban mozgott. Az inter-assay értékek a 3,9 - 23,8%-os tartományban változtak. A négy (4) negatív mintát mindkét elemzésből kizárták.

REFERENCIÁK

- 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) Concensus 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.
- 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.
- 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-Floer, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.
- Nucci, M. and Anaisse, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.
- 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.
- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemophlym 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 (13)-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* 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 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., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, 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 gauze 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-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
- 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.
- 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.
- 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.

TOVÁBBI, NEM HIVATKOZOTT IRODALOM

- Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeken, E., De Munter, P., Meersseman, W., Van Meensel, B., Van Eldere, J., Lagrou K. 2009. Serum (1→3)-β-D-Glucan as a diagnostic tool for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection or hematological malignancy. J. Clin. Microbiol. 47: 3871-3874.
- Koo, S., Bryar, J.M., Page, J.H., Baden, L.R., Marty, F.M. 2009. Diagnostic performance of the (1→3)-β-D-Glucan assay for invasive fungal disease. Clin. Infect. Dis. 49:1650-9.
- Ellis, M., Ramadi, B., Finkelman, M., Hedstrom, U., Kristenson, J., Ali-Zadeh, H., and Klingspor, L. 2007. Assessment of the clinical utility of serial β-D-Glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. J. Med. Microbiol. 57: 287-95.
- Marty, F.M., Lowry, C.M., Lemptiski, S.J., Kubiak, D.W., Finkelman, M.A., and Baden, L. R., 2006. Reactivity of (1→3)-β-D-Glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemo. 50: 3450-3453.
- Marty, F. M., Koo, S., Bryar, and J., and Baden, L.R. 2007. (1→3)-β-D-Glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jirovecii* pneumonia. Ann. Int. Med. 147: 70-72.
- Obayashi, T., Yoshida, M., Tamura, H., 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. Immunno. 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., Iuchi, 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.

	„Lejárati idő”
	„N” teszt elvégzéséhez elegendő mennyiséget tartalmaz”
	„Téltelkód”
	„In vitro diagnosztikum”
	„Termékszám”
	„Hőmérséklet-korlátozás”
	„Gyártó”
	„Tanulmányozza a használati utasítást”
	„Hivatalos képviselő”

„CE-jelzés”

	Associates of Cape Cod International, Inc.
	Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, UK