

**Tyrimo rinkinys (1→3)-β-D-gliukanui serume nustatyti**

**FUNGITELL®**

**Naudojimo instrukcija**



**ASSOCIATES OF  
CAPE COD  
INCORPORATED**

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

Tel.: +1 508 540-3444  
Nemokamas numeris: +1 888 395-2221  
Faks.: +1 508 540-8680  
Techninė pagalba: +1 800 848-3248  
Klientų aptarnavimo skyrius: +1 800 525-8378



42

PNO01268-It Rev 000 Peržiūrėta 2007 gruodis

#### PASKIRTIS

Tyrimo rinkinys „Fungitell“ yra proteazės žimogenu parentas kolorimetrinis tyrimas, skirtas kokybiškai nustatyti (1→3)-β-D-gliukaną serume pacientų, kuriems pasireiškė invazinės grybelinės infekcijos simptomai arba susidarė medicininės sąlygos, dėl kurių pacientas yra linkęs užsikrėsti tokia infekcija. Pagrindinio įvairių medicinoje svarbių grybelių ląstelių sienelės komponento (1→3)-β-D-gliukano koncentracija serume gali būti naudojama kaip pirmenė diagnozuojant paslėptas mikozes ir fungemijas. Teigiamas rezultatas nenurodo, kokios klasės grybelis galėjo sukelti infekciją.

Tyrimo rinkinys skirtas diagnozuoti numanomą grybelinę infekciją. Jis turi būti naudojamas drauge su kitomis diagnostinėmis procedūromis, pavyzdžiui, auginant mikrobiologinę kultūrą, atliekant histologinį biopsijos mėginių tyrimą ir radiologinį tyrimą.

<p><b>Svarbu – šią informaciją rekomenduojama perduoti užklausą pateikusiam gydytojui:</b></p> <p>Analizatoriumi „Fungitell“ negalima nustatyti konkrečių grybelių rūšių, pavyzdžiui, <i>Cryptococcus</i> (9), kuris išskiria labai nedidelį kiekį (1→3)-β-D-gliukano. Šiuo tyrimu taip pat negalima nustatyti tokių zigomicetų kaip <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> ir <i>Rhizopus</i> (17), kurie žinomi kaip negaminantys (1→3)-β-D-gliukano. Be to, <i>Blastomyces dermatitidis</i> mielių fazė išskiria nedidelį (1→3)-β-D-gliukano kiekį, kurio negalima nustatyti šiuo tyrimu (18).</p> <p><b>Šį teiginį įtraukite pateikdami gliukano tyrimo rezultatus.</b></p>
---

#### SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

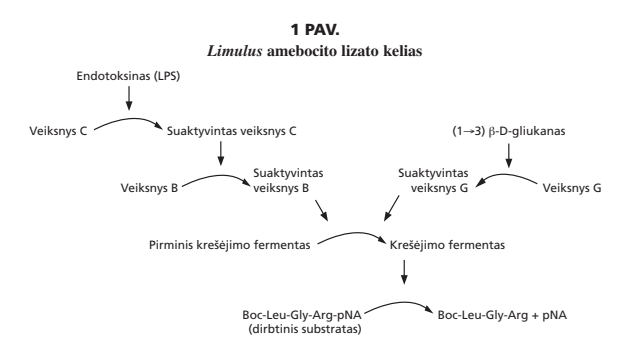
Pirminių ir oportunistinių patogenų sukeltomis grybelinėmis infekcijomis susergama vis dažniau, ypač jei paciento imunitetas susilpnėjęs (2, 3, 4). Invazinės grybelinės ligos, pavyzdžiui, oportunistinės infekcijos, yra paplitusios tarp pacientų, sergančių piktybinėmis kraujo ligomis bei AIDS, ir prisideda prie didėjančio nozokominių infekčių skaičiaus, ypač tarp pacientų, kuriems buvo persodinti organai ar kurie buvo gydomi imunitetą slopinančiais vaistais (1, 4). Daugeliu grybelinių ligų susergama įkvėpus grybelių sporų, atsiradusių iš dirvos, augalų liekanų, oro valdymo sistemų ir / arba užkrėstų paviršių. Kai kurių oportunistinių grybelių yra ant žmogaus odos / odoje, virškinimo trakte ir gleivinėje (7). Invazinių mikozių ir fungemijų diagnozė dažnai parenta nespecifiniais diagnostiniais ar radiologiniais metodais.

Dažniausiai pasitaikantys pirminiai žmogaus grybeliniai patogenai yra *Candida* spp. ir *Aspergillus* spp. Oportunistiniai grybeliniai patogenai apima *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* ir *Pneumocystis carinii*. Šių ir kitų organizmų išskiriama (1→3)-β-D-gliukaną galima nustatyti analizatoriumi „Fungitell“ (4, 5, 16).

#### PROCEDŪROS PRINCIPAS

Analizatoriumi „Fungitell“ galima išmatuoti (1→3)-β-D-gliukano kiekį. Analizatoriaus veikimas parentas modifikuotu *Limulus* ameobocito lizato (LAL) keliu (8-11), 1 pav. Reagentas „Fungitell“ modifikuojamas, kad pašalintų veiksnį C, todėl veiksnio G reguliuojama kelio šaka reaguoja tik į (1→3)-β-D-gliukaną.

(1→3)-β-D-gliukanas aktyvina veiksnį G – serino proteazės žimogeną. Suaktyvintas veiksnys G keičia neaktyvų pirminį krešėjimo fermentą į aktyvų krešėjimo fermentą, kuris atskelia pNA nuo chromogeninio baltymo substrato Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, taip susidaro chromoforas, sugeriantis šviesą, kai bangos ilgis lygus 405 nm. Toliau aprašytas kinetinis tyrimas analizatoriumi „Fungitell“ yra parentas mėginio sukello optinio tankio padidėjimo matavimu. Šis padidėjimas aiškinamas remiantis standartine kreive, kad būtų galima nustatyti (1→3)-β-D-gliukano koncentraciją mėginyje.



#### „FUNGITELL“ RINKINIO SUDĖTIS

„Fungitell“ rinkinys skirtas *in vitro* diagnostikai. Šių medžiagų, pridedamų kiekviename rinkinyje, pakanka ištirti 110 šulinėlių dvejiose mikrotitravimo plokštelėse (po 55 šulinėlius kiekvienoje):

- Reagentas „Fungitell“<sup>™</sup>, liofilizuotas (1→3)-β-D-gliukano universalus specifinis LAL (du buteliukai).
- „Pyrosol“ paruošimo buferis, Tris HCl 0,2 M, pH 7,4 (du buteliukai).
- Gliukano standartas, liofilizuotas pakimanas ir inertiškas užpildas su etiketėje nurodytu (1→3)-β-D-gliukano kiekiu (du buteliukai).
- Reagento laipsnio vanduo (RGW) (du buteliai).
- Piroplokštelės: plokščių dugnu, 96 šulinėliai, nepadengtos mikroplokštelės, su dangteliais, nėra trukdančių gliukanų (dvi).
- KCl 1,2 M (vienas buteliukas).
- KOH 0,25 M (vienas buteliukas).

Visose minėtose medžiagose, išskyrus standartą, nėra trukdančio (1→3)-β-D-gliukano kiekio.

#### REIKALINGOS, BET NETIEKIAMOS MEDŽIAGOS

Jokiose medžiagose negali būti trukdančio gliukano. Stiklinius indus būtina sausame karštyje deprogeninti mažiausiai 235°C temperatūroje 7 valandas (arba atitinkamoje aplinkoje), kad jie būtų tinkami naudoti.

- Pipetės antgaliai\* (250 μl – kat. Nr. PPT25, 1000 μl – kat. Nr. PPT10).
- 5–25 μl ir 100–1000 μl talpos pipetės.
- Pakopinė pipetė, su švirkštiniais antgaliais, 100 μl talpos.
- Mėgintuvėliai\* standarto serijos ruošti ir serumo apdorojimo reagentams maišyti. (13 x 100 mm borosilikato stiklas – kat. Nr. TB013)
- Incubacinis (37°C) plokščiųlų skaitytuvas, kuriuo galima atlikti stebėjimus esant dviem bangos ilgiams, 405 nm ir 490 nm, ir kurio dinaminis diapazonas būtų mažiausiai 2,0 sugerties vienetai, sujungtas su tinkama kompiuterine kinetinio tyrimo programa.
- Steriliūs, savo sudėtyje neturintys gliukano saugojimo mėgintuvėliai užsakumu dangteliu kartotiniams mėginiams (daugelyje mėgintuvėlių, kurių sudėtyje, kaip patvirtinta pažymėjimais, nėra RNazių, DNazių ir pirogenų, nėra ir trukdančio (1→3)-β-D-gliukano) kiekio.
- „Parafilm“<sup>®</sup>

\* Šiuose produktuose, kuriuos tiekia „Associates of Cape Cod, Inc. (ACC)“, nėra trukdančio gliukano (patvirtinta pažymėjimais).

**Dėmesio:** stiklinės pipetės su medvilnės kamšteliais yra galimas užteršimo gliukanu šaltinis.

#### ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

*Šis produktas skirtas tik IN VITRO DIAGNOSTIKAI.*

<p>Naudojant „Fungitell“ analizatorių, būtina tiksliai laikytis metodo ir tyrimo aplinkos reikalavimų. Tyrimo veiksmingumui didelės įtakos daro tinkamas laboratorijos darbuotojo išmokymas taikyti analizės metodą ir išvengti užteršimo.</p>
--

- Fungitell“ analizatoriumi neaptinkamos rūšys. Tam tikros grybelių rūšys išskiria labai nedidelį kiekį (1→3)-β-D-gliukano ir dažniausiai neaptinkamos naudojant „Fungitell“ analizatorių. Tai *Cryptococcus* gentis (14, 16) bei tokie zigomicetai kaip *Absidia*, *Mucor* ir *Rhizopus* (16, 17). Be to, mielinė *Blastomyces dermatitidis* forma išskiria labai nedidelį kiekį (1→3)-β-D-gliukano, todėl dažniausiai neaptinkama taikant analizatorių „Fungitell“ (18).
- Netraukite pipetę jokių medžiagų burna. Nerūkykite, nevalgykite ir negerkite vietose, kuriose yra mėginiai ar rinkinio reagentai.
- Tyrimą atlikite švarioje aplinkoje. Naudokite medžiagas ir reagentus, kuriuose nėra trukdančio (1→3)-β-D-gliukano kiekio (patvirtinta pažymėjimais). Atminkite, kad dėl užteršimo gliukanu ir grybeliais nuo žmogaus kūno, drabužių, talpyklų, vandens ir ore esančių dulkių gali būti trikdomas analizatoriaus „Fungitell“ veikimas.
- Nenaudokite reagentų, kurių galiojimo laikas pasibaigęs.

- Trukdžius gali sukelti neįprastos spalvos ar drumsti mėginiai, pavyzdžiui, stipriai hemolizuoti, lipemiški ar jei juose yra per didelis bilirubino kiekis. Jei tyrimas vis dėl to atliekamas, tyrimo rezultatus būtina patikrinti ir įsitikinti, ar nėra optinės interferencijos ir / arba neįprastų kinetinių požymių.
- Dirbami su pacientų mėginiais, naudokite tinkamus apsauginius drabužius ir mitteliais nepadengtas pirštines.
- Pacientų, kuriems taikoma hemodializė ir naudojamos tam tikros celiuliozės membranos, serume gali būti didelis veiksnis (1→3)-β-D-gliukano. Jei hemodializei naudojamos celiuliozės triacetato membranos arba polimetilo metakrilato membranos, poveikio tyrimo rezultatams nepastebėta.
- Chirurginiai tvarsčiai ir tamponai gali išskirti didelį (1→3)-β-D-gliukano kiekį, galintį lemti dėl užteršimo pasireiškiantį trumpalaikį teigiamą tyrimo „Fungitell“ rezultata, kuris pastebimas tiriant pacientus po operacijų (6).
- Nenaudokite rinkinių, kurių sudėtinės dalys pažeistos.
- Medžiagos, susilietusios su galimai užterštu skysčiu (kurio sudėtyje yra patogenų), turi būti išmestos laikantis vietos taisyklų.

#### Reagentų laikymas

Visus reagentus laikykite originaliose pakuotėse, 2–8 °C temperatūroje tamsioje. Paruoštą „Fuניתell“ reagentą būtina saugoti 2–8 °C temperatūroje ir sunaudoti per 2 valandas. Arba paruoštą „Fungitell“ reagentą galima užšaldyti -20°C temperatūroje ne ilgiau nei 20 dienų, vieną kartą atšildyti ir sunaudoti.

#### Bandinių tvarkymas

- Bandinių surinkimas: serumo mėginius reikia surinkti į sterilius vakuuminius mėgintuvėlius (raudonais kamšteliais) arba į serumo atskyrimo mėgintuvėlius (SST) ir palaukti, kol sukrešės. Tada serumas atskiriamas nuo krešulio ir dekantuojamas į tinkamą talpyklą, kurioje nėra trukdančio (1→3)-β-D-gliukano kiekio.
- Bandinių laikymas: serumo mėginius galima laikyti 2–8 °C temperatūroje prieš tyrimą arba užšaldytą -20°C ar žemesnėje temperatūroje.
- Bandinių žymėjimas: bandinius būtina aiškiai pažymėti laikantis patvirtintos institucijos praktikos.

#### PROCEDŪRA

Pastaba: naudojant skirtingus instrumentus ir programinę įrangą, nustatymai gali skirtis. Bendru atveju taikoma tokia procedūra: nustatykite, kad plokštelės skaitytuvo programa kauptų duomenis veikdama Vmean režimu. Programinės įrangos naudojimo instrukcijoje nurodyta, kokia yra tinkami nustatymai, užtikrinantys, kad apskaičiuota reikšmė yra visų duomenų taškų optinio tankio pokyčio vidurkis. Optinis tankis turi būti matuojamas kas 15–30 sekundžių. Programinės įrangos nustatytas bangos ilgis turi būti 405 nm minus fonas, esantis 490 nm bangos ilgiui. Jei matuoti esant dviem bangos ilgiams negalima, matuokite esant 405 nm bangos ilgiui. Nustatykite 37°C inkubavimo temperatūrą. Prieš pradėdat matavimus, plokštelė turi būti purtoma 5–10 sekundžių. Kreivės atitikimo nustatymas turi būti „tiesinis / tiesinis“ arba ekvivalentiškas. Matavimas turi būti pradėtas nedelsiant.

- Rinkinyje pridėtas gliukano standartinio tirpalo paruošimas.
  - Vieno gliukano standartinio tirpalo buteliuko turinį ištirpinkite ant buteliuko nurodytame RGW tirtyje, kad susidarytų 100 pg/ml tirpalas. Centrifuguokite su „Vortex“ mažiausiai 30 sekundžių, kad resuspenduotumėte (1 tirpalas). Gliukano tirpalas turi būti saugomas 2–8 °C temperatūroje ir sunaudotas per tris dienas. Toliau nurodyti veiksmai iliustruoja standartinės kreivės paruošimo schemas pavyzdį.
  - Paruoškite 50 pg/ml standartinio tirpalo, sumaišydami 500 μl RGW ir 500 μl 1 tirpalo gliukano neturiniame mėgintuvėlyje (2 tirpalas). Centrifuguokite su „Vortex“ mažiausiai 10 sekundžių.
  - Paruoškite 25 pg/ml standartinio tirpalo, sumaišydami 500 μl RGW ir 500 μl 2 tirpalo gliukano neturiniame mėgintuvėlyje (3 tirpalas). Centrifuguokite su „Vortex“ mažiausiai 10 sekundžių.
  - Paruoškite 12,5 pg/ml standartinio tirpalo, sumaišydami 500 μl RGW ir 500 μl 3 tirpalo gliukano neturiniame mėgintuvėlyje (4 tirpalas). Centrifuguokite su „Vortex“ mažiausiai 10 sekundžių.
  - Paruoškite 6,25 pg/ml standartinio tirpalo, sumaišydami 500 μl RGW ir 500 μl 4 tirpalo gliukano neturiniame mėgintuvėlyje (5 tirpalas). Centrifuguokite su „Vortex“ mažiausiai 10 sekundžių.
- Serumo pirminio apdorojimo reagento paruošimas. Šarminis serumo pirminio apdorojimo reagentas keičia trigrandžius gliukanus į vienagrandžius gliukanus (10, 11), kurie labiau reaguoja analizatoriuje. Aukštas pH taip pat stabdo serino proteazę ir serino proteazių inhibitorių, kurie atitinkamai gali lemti klaidingą teigiamą arba klaidingą neigiamą rezultata, aktyvumą serume (20).
  - Paruoškite serumo pirminio apdorojimo reagentą, sumaišydami vienodą tūrį 0,25 M KOH ir 1,2 M KCl, paskui smarkiai centrifuguokite su „Vortex“. Rekomenduojama sumaišyti ne daugiau kaip po 900 μl kiekvieno reagento, kad būtų galima paruošti du ruošinius. Buteliukus uždenkite plėvele „Parafilm“, kad reagentus galėtumėte panaudoti antrai plokštei tirti. Buteliukus uždenkite ta plėvelės „Parafilm“ puse, kuri nukreipta į popieriaus pagrindą.

- Pastaba: brėždami standartinę kreivę, standartinių tirpalų koncentraciją padauginkite iš penkių, kad intervalas būtų nuo 500 iki 31 pg/ml. Į programines įrangos nuostatas įveskite standartinį tirpalų koncentracijas atitinkamai 500, 250, 125, 62,5 ir 31 pg/ml.

*Standarto tūris analizatoriuje yra po 25 μl šulinėlyje arba penkis kartus didesnis nei serumo mėginio tūris. Mikrotitravimo plokštelė, į kurią pripildoma standarto (St), neigiamos kontrolės (Neg) ir 21 nežinomas mėginio (Uk), kurių kiekvienas analizuojamas du kartus, užpildoma tokiu būdu:*

	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												

- Pastaba: išorinius šulinėlius galima naudoti ,jei nustatyta, kad išorinių šulinėlių savybės panašios į vidinių šulinėlių savybes.
- Pastaba: siekdami išvengti netyčinio užteršimo, į šulinėlius supylę mėginius ir reagentus, mikroplokštelę uždenkite dangteliu. Prieš įdedami plokštelę į skaitytuvą, dangtelį nuimkite, kad išvengtumėte optinės interferencijos dėl kondensato.

- Serumo ir pirminio apdorojimo reagento pridėjimas.
  - Užšaldytus serumo mėginius atitirpinkite kambario temperatūroje. Visus mėginius gerai sumaišykite su „Vortex“.
  - Įpilkite po 5 μl serumo mėginio į tam skirtus šulinėlius (Uk) (mažiausiai po du kartojimus). Kiekvieno serumo mėginio įpilkite pakartotinai.
  - Į kiekvieną šulinėlį su serumu įpilkite po 20 μl serumo pirminio apdorojimo reagento. *Pastaba:* jei laboratorijos darbuotoji patogiai, b ir c veiksmus galima atlikti atvirktinė seka.
  - Plokštelę purtykite 5–10 sekundžių, kad gerai susimaišytų šulinėlių turinys (galima pasirinkti skaitytuvo plokštelės purtymo funkciją), inkubuokite 10 minučių 37°C temperatūroje inkubacinės plokštelės skaitytuve.
- „Fungitell“ reagento paruošimas. Pastaba: šį veiksmą patogiu atlikti, kai vyksta pirminio apdorojimo inkubavimo procesas.
  - Paruoškite vieną buteliuką „Fungitell“ reagento, įpildami 2,8 ml RGW ir 2,8 ml „Pyrosol“ paruošimo buferio, naudodami 1000 μl pipetę. Buteliuką uždenkite „Parafilm“ plėvelės „Parafilm“ puse, kuri buvo nukreipta į popierinį pagrindą. Švelniai pasukite buteliuką, kad turinys visiškai išstruktų – nenaudokite „Vortex“.
  - Neigiamos kontrolės ir gliukano standartinių tirpalų pylimas. Baigiantis serumo pirminio apdorojimo inkubavimo procesu (3.d veiksmas), plokštelę išimkite iš inkubavimo plokštelės skaitytuvo ir į ją įpilkite standartinius tirpalus ir neigiamos kontrolės tirpalus.
    - Į G2 ir G3 šulinėlius įpilkite po 25 μl RGW.
    - Į F2 ir F3 šulinėlius įpilkite po 25 μl 6,25 pg/ml 5 standartinio tirpalo.
    - Į E2 ir E3 šulinėlius įpilkite po 25 μl 12,5 pg/ml 4 standartinio tirpalo.
    - Į D2 ir D3 šulinėlius įpilkite po 25 μl 25 pg/ml 3 standartinio tirpalo.
    - Į C2 ir C3 šulinėlius įpilkite po 25 μl 50 pg/ml 2 standartinio tirpalo.
    - Į B2 ir B3 šulinėlius įpilkite po 25 μl 100 pg/ml 1 standartinio tirpalo.
  - „Fungitell“ reagento pridėjimas ir plokštelės inkubavimas.
    - Pakopine pipete įpilkite po 100 μl „Fungitell“ reagento į kiekvieną šulinėlį (kuriose yra neigiamos kontrolės tirpalai, standartiniai tirpalai ir mėginiai).
    - Dangteliu uždengtą plokštelę įdėkite į mikroplokštelės skaitytuvą (pusiausvra nustatyta 37°C temperatūroje) ir purtykite 5–10 sekundžių. Plokštelės rezultatus matuokite skaitytuvu, nuėmę dangtelį, esant 405 nm minus 490 nm bangos ilgiui, 40 minučių 37°C temperatūroje. Jei fono duomenį (esant 490 nm bangos ilgiui) atimti negalima, matavimus galima atlikti esant 405 nm bangos ilgiui. Jei mikroplokštelės skaitytuvas neturi plokštelės purtymo funkcijos, galima naudoti išorinį mikroplokštelės purtyklę.
    - Surinkite ir išanalizuokite duomenis: apskaičiuokite optinio tankio pasikeitimo vidurkį (sugerties milvienetai per minutę) kiekviename taške nuo 0 iki 40 minučių).

#### REZULTATŲ AIŠKINIMAS

„Fungitell“ tyrimo rezultatai turi būti naudojami kaip pagalbinė priemonė diagnozuojant invazinę grybelinę infekciją. Rezultatai reiškiami pg/ml serumo ir gali siekti nuo neaptinkamo (<31 pg/ml) iki > 500 pg/ml dydžio, atspausdinami programine įranga arba nustatomi pagal standartinę kreivę. Jei tikslį reikšmė viršija 500 pg/ml, mėginį reikia atskiesti RGW ir dar kartą ištirti.

Tyrimą atliekančios laboratorijos darbuotojai turi įspėti užsakančį gydytoją, kad analizatoriumi „Fungitell“ negalima nustatyti konkrečių grybelių rūšių, pavyzdžiui, *Cryptococcus* (16, 17), kuris išskiria labai nedidelį kiekį (1→3)-β-D-gliukano. Šiuo tyrimu taip pat negalima nustatyti

tokių zigomicetų kaip *Absidia*, *Mucor* ir *Rhizopus* (16, 17), kurie žinomi kaip negaminantys (1→3)-β-D-gliukano. Panašiai ir *Blastomyces dermatitidis* mielių fazė išskiria nedidelį (1→3)-β-D-gliukano kiekį, kurio negalima nustatyti šiuo tyrimu (18).

#### NEIGIAMAS REZULTATAS

Jei (1→3)-β-D-gliukano kiekis yra < 60 pg/ml, toks rezultatas laikomas neigiamu.

#### TEIGIAMAS REZULTATAS

Didesnės nei 80 pg/ml reikšmės laikomos teigiamu rezultatu. Teigiamas rezultatas reiškia, kad buvo aptikta (1→3)-β-D-gliukano. Teigiamas rezultatas nereiškia ligos, todėl norint nustatyti diagnozę, turi būti naudojamas drauge su kitų klinikinių tyrimų rezultatais.

#### NEAIŠKŪS REZULTATAI

Reikšmės nuo 60 iki 79 pg/ml reiškia galimą grybelinę infekciją. Rekomenduojama paimti papildomus serumo mėginius ir juos iširti. Dažnas mėginiių ėmimas ir tyrimas didina diagnozės patikimumą.

#### KOKYBĖS KONTROLĖ

- Standartinės kreivės (tiesinis / tiesinis) koreliacijos koeficientas (r) turi būti > 0,980.
- Šulinėliai su (25 μl RGW) yra neigiama kontrole. Neigiamų kontrolių faktinis optinis tankis (Vmean) turi būti mažesnis nei 50 % mažiausio standartinio tirpalo optinio tankio. Jei ne, tyrimą būtina pakartoti naudojant visiškai naujus reagentus.
- Sudėtingų mėginių tyrimas. Jei tyrėjas pastebi, kad mėginys yra neskaidrus, neįprastos spalvos ar drumstas kaip, pavyzdžiui, smarkiai hemolizuoti, lipemiški ar tokie mėginiai, kuriuose yra per didelis bilirubino kiekis, jį reikia atskiesti su RGW ir iširti dar kartą. Apie atskiedimą būtina nurodyti rezultatų ataskaitoje, rezultatą padauginus iš skiedimo koeficiento. Tipiniu atveju skiedimo koeficientas įvedamas į programinę įrangą nustatant mėginio nuostatas ir pataisa taikoma automatiškai.
- Kontroliniai mėginiai, nustačius galutinę ribą ar labai aukštą teigiamą rezultatą, gali būti tiriami dar kartą, siekiant įsitikinti, ar reagentai ir tyrimo rinkinys veikia tinkamai. Kiekvienas tyrėjas privalo susipažinti su kokybės kontrolės programa, kad užtikrintų profesionalų tyrimo atlikimą.

#### TYRIMO APRIBOJIMAI

- Grybelinės infekcijos buvimas audiniuose (10), kapsulės susidarymas ir tam tikrų grybelių išskiriamas (1→3)-β-D-gliukano kiekis gali lemti šios analitės koncentraciją serume. Sumažėjęs gebėjimas pernešti (1→3)-β-D-gliukaną į kraujotaką gali sumažinti gebėjimą aptikti konkrečias grybelines infekcijas. *Cryptococcus* spp. išskiria nedidelį (1→3)-β-D-gliukano kiekį (11), nes ląstelė yra kapsulėje. Zigomicetai, įskaitant *Absidia*, *Mucor* spp. ir *Rhizopus* spp. (16, 17), žinomi kaip negaminantys (1→3)-β-D-gliukano (16, 17). *Blastomyces dermatitidis* mielių fazė išskiria nedidelį (1→3)-β-D-gliukano kiekį, todėl tyrimo rezultatai dažniausiai būna neigiami (18).
- Kai kurių pacientų organizme (1→3)-β-D-gliukano kiekis yra padidėjęs ir patenka į neaiškių rezultatų intervalą. Tokiais atvejais rekomenduojama atlikti papildomą tyrimą.
- Paciento tyrimo dažnis priklauso nuo santykinio grybelinės infekcijos pavojaus. Pacientų, kuriems padidėjęs pavojus susirgti, mėginius rekomenduojama imti mažiausiai 2–3 kartus per savaitę.
- Teigiami rezultatai nustatyti pacientams, kuriems taikoma hemodializė (12, 13), pacientams, gydytiems konkrečiais frakcionuoto kraujo produktais, pavyzdžiui, serumo albuminu ir imunoglobulinais (19), bei mėginiuose ar pacientams, kurie lietiš ai kuriems buvo taikomi savo sudėtyje gliukano turintys varsčiai. Pacientų serume bazinis (1→3)-β-D-gliukano lygis atsitapo per 3–4 dienas po chirurginės intervencijos, kurios metu buvo naudojami savo sudėtyje (1→3)-β-D-gliukano turintys tamponai ir tvarsčiai (6). Todėl į tai būtina atsižvelgti imant mėginius pacientų, kuriems atlikta chirurginė operacija.
- Mėginiai, paimti įdūrus į kulną ar pirštą, yra netinkami, nes dūrio vietai paruošti naudojamas alkoholiu suvilgytas tamponas (ir galbūt kraujo sankaupa odos paviršiuje) užkrečia mėginius.
- Nustatyti suaugusių pacientų tyrimo lygiai. Kūdikii ir vaikų įprasti lygiai panašūs į suaugusiųjų (21). Nėra pakankamai duomenų apie naujagimių ir jaunesnių nei šešių mėnesių amžiaus kūdikių lygius.
- Tyrimo rezultatai nurodomi, jei patenka į intervalą nuo 31 pg/ml iki 500 pg/ml. Jei reikšmė mažesnė nei 31 pg/ml, rezultatas nurodomas kaip < 31 pg/ml. Jei reikšmė didesnė nei >500 pg/ml, rezultatas nurodomas kaip > 500 pg/ml.

#### TRUKDANČIOS MEDŽIAGOS

Toliau nurodyta mėginio būklė gali trukdyti gauti tikslų „Fungitell“ tyrimo rezultatų:

- hemolizė,
- dėl lipemijos atsiradęs mėginio drumstumas,
- plika akimi matomas bilirubinas mėginyje,
- neskaidrus serumas.

#### TIKĖTINOS REIKŠMĖS

Beta gliukano reikšmė padidėja užsikrėtus įvairiomis grybelinėmis infekcijomis. Jei pastebimi požymiai ir simptomai, kai reikšmė yra 80 pg/ml ar didesnė, tikimybė, kad pacientas yra užsikrėtęs grybeline infekcija, siekia nuo 74,4 iki 91,7 % (2 lentelė). Jei jokių požymių ir

simptomų nepastebima, kai reikšmė mažesnė nei 60 pg/ml, tikimybė, kad pacientas neužsikrėtęs, siekia nuo 65,1 % iki 85,1 %.

#### VEIKIMO CHARAKTERISTIKA

##### Palyginamasis tyrimas

Buvo atliktas daugiacentris laukiamas tyrimas, siekiant įvertinti „Fungitell“ analizatoriaus charakteristikas. Tyrimas palygintas su kitais standartiniais mikozijų ir fungemijų nustatymo metodais (pvz., kraujo kultūros auginimu, biopsijos mėginio histopatologiniu tyrimu ir žymėjimu radiologiniais žymenimis).

Trijų šimtų penkiasdešimt devynių (359) pacientų mėginiai buvo iširti šiuo analizatoriumi. Iš kiekvieno paciento buvo paimta po vieną mėginį. Tarp pacientų, kuriems pavojus užsikrėsti yra mažas, buvo akivaizdžiai sveiki asmenys ir kliniškai gydomi pacientai, kurie pateko į ligoninę dėl kitokių susirgimų nei grybelinės infekcijos. Pacientai buvo tiriami šešiose gydymo įstaigose JAV. Keturiuose gydymo įstaigose buvo atliekamas tyrimas ir iš viso iširti 285 mėginiai. ACC ištyrė visus 359 mėginius po du kartus, bet vertinant analizatoriaus veikimą naudojo tik pakartotinio tyrimo rezultatus. Pakartotinio tyrimo rezultatai statistiškai nesiskyrė nuo pirmojo tyrimo rezultatų.

Visos tiriamųjų populiacijos (359) jautrumas, įskaitant *Cryptococcus*, buvo 65,0 % (patikimumo intervalas – 60,1–70,0 % (PI)). Specifiškumas – 81,1 % (PI 77,1–85,2 %) (1 lentelė). Rezultatų gautų keturiuose tyrimo vietoje, jautrumas siekė nuo 50,0 % iki 66,7 %. 285 iširtų mėginių specifiškumas siekė nuo 70,0 % iki 93,0 % (2 lentelė).

<b>1 lentelė</b>	<b>ACC tyrimo rezultatai, kai galutinė riba 60–80 pg/ml kiekvienoje tyrimo vietoje</b>							
Vieta	Įrodytas / galimas Jautrumas ≥80 pg/ml			Specifiškumas <60 pg/ml				Iš viso
	Teig./klin. teig.	Jautrumas	Teigiama numanoma reikšmė	Neig./klin. neig.	Specifiškumas	Neigiama numanoma reikšmė	Neaiškūs 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	Nenurodyta	0/0	Nenurodyta	0.0	0	1
Iš viso*	106/163	65.0	80.9	159/196	81.1	76.8	21	359

**\*Itrauktas vienas mėginys, paimtas 6 tyrimo vykdymo vietoje.** ACC (359 mėginiai) ir gydymo įstaigose (285 mėginiai) gautus rezultatus palyginus su klinikinė diagnoze, ACC jautrumas siekia 64,3 % (PI 58,8 %–69,9 %), o gydymo įstaigose – 61,5 % (PI 55,9 %–67,2 %). Specifiškumas ACC siekia 86,6 % (PI 82,7 %–90,6 %), o gydymo įstaigose 79,6 % (PI 74,9 %–84,3 %) (2 lentelė).

<b>2 lentelė</b>	<b>Tyrimo rezultatai tyrimo vykdymo vietoje, kai galutinė riba 60–80 pg/ml kiekvienoje tyrimo vietoje</b>							
Vieta	Įrodytas / galimas Jautrumas ≥80 pg/ml			Specifiškumas <60 pg/ml				Iš viso
	Teig./klin. teig.	Jautrumas	Teigiama numanoma reikšmė	Neig./klin. neig.	Specifiškumas	Neigiama numanoma reikšmė	Neaiškūs 60<=X<80	
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 *								
Iš viso, tyrimo vietas	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

**\* Ne tyrimo vykdymo vieta**

#### KANDIDOZĖ

Atliekant laukiamą tyrimą,107 pacientams diagnozuota kandidozė. 83 iš 107 atvejų tyrimo „Fungitell“ analizatoriumi rezultatai buvo teigiami.

Candida

Šimtas septyniadsdešimt penki kandidozės mėginiai perduoti „Associates of Cape Cod“. 145 iš 175 atvejų tyrimo analizatoriumi rezultatai buvo teigiami.

Aspergillus

Aspergiliozė diagnozuota iš viso 10 pacientų. 8 iš 10 teigiami tyrimo rezultatai nustatyti analizatoriumi.

#### FUZARIOZĖ

Trims pacientams nustatyta fuzariozė. 2 iš 3 teigiami tyrimo rezultatai nustatyti analizatoriumi.

Cryptococcus

##### GRYBELIO GYDYMAS VAISTAIS

Grybelio gydymo vaistais taikymas ar netaikymas tyrimo jautrumui statistinės reikšmės neturėjo. 118 pacientų buvo nustatyta invazinė grybelinė infekcija ir tai, kad jiems taikomas gydymas nuo grybelio. 82 pacientams infekcija nustatyta analizatoriumi (jautrumas 69,5 %; PI 61,2 %–77,8 %). Be to, dvidešimt keturiems (24) pacientams buvo nustatyta infekcija ir tai, kad jiems netaikomas gydymas nuo grybelio. 18 pacientų infekcija nustatyta analizatoriumi (jautrumas 75 %; PI 57,7 %–92,3 %).

#### SPECIFIŠKUMAS

Iš viso 170 pacientų grybelinė infekcija nenustatyta ir jie buvo akivaizdžiai sveiki pacientai. Specifiškumas tiriant analizatoriumi siekė 86,5 % (PI 82,8 %–90,1 %). Papildomai įtraukus 26 pacientus, kuriems grybelinė infekcija nenustatyta, tačiau kuriems pasireiškė kiti negalavimai, specifiškumas siekė 81,1 % (PI 77,1–85,2 %).

#### TYRIMO KORELIACIJA

Keturiuose gydymo įstaigose iš viso iširti 285 mėginiai. Tyrimo vietoje gautų rezultatų ir „Associates of Cape Cod“ rezultatų kokybinė koreliacija siekė 96,4 %. „Associates of Cape Cod“ rezultatų ir skirtingose tyrimo vietoje gautų rezultatų kokybinė koreliacija siekė nuo 90,6 iki 99,2 %.

#### TIKSLUMAS

Atliekant tikslumo tyrimus, dešimt (10) skirtingų mėginių buvo iširta trijose tyrimo vykdymo vietoje trimis skirtingomis dienomis. Vidinis tyrimo nuokrypis siekė nuo 0,9 iki 28,9 %.

Reikšmės tarp tyrimų skyrėsi nuo 3,9 iki 23,8 %. Keturi (4) neigiami mėginiai buvo pašalinti iš abiejų tyrimų.

Fungus

- 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., and Hashimoto, 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.

Fungus

##### PAPILDOMA LITERATŪRA (NECIUOTA)

- 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. 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., 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.

	<b>„Sunaudoti iki“</b>
	<b>„Turinio pakanka „N<sup>4</sup>“ tyrimams“</b>
	<b>„Serijos kodas“</b>
	<b>„In vitro diagnostinis medicininis prietaisas“</b>
	<b>„Katalogo Nr.“</b>
	<b>„Temperatūros apribojimai“</b>
	<b>„Žr. naudojimo instrukciją“</b>
	<b>„Ilgaliotasis atstovas“</b>
	<b>„CE ženklas“</b>
	<b>Associates of Cape Cod® International, Inc.</b> Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Jungtinė Karalystė