

Test do wykrywania (1→3)-β-D-glukanu w surowicy	
FUNGITELL®	
Instrukcja użytkowania	
	
Telefon: +1 508 540-3444 Połączenie bezpłatne: +1 888 395-2221 Telefaks: +1 508 540-8680 Pomoc techniczna: +1 800 848-3248 Biuro Obsługi Klienta: +1 800 525-8378	
PN001268-pl	Wersja 000 zmieniona w grudniu 2007 r.

PRZEZNACZENIE

Test Fungitell jest metodą kolorymetryczną opartą na zymogenie proteazy do jakościowego wykrywania (1→3)-β-D-Glukanu w surowicy pacjentów z objawami lub chorobami predysponującymi do inwazyjnego zakażenia grzybiczego. Stężenie w surowicy (1→3)-β-D-Glukanu, istotnego składnika ściany komórkowej różnych grzybów o znaczeniu medycznym, może być stosowane jako pomoc w rozpoznaniu głębokich grzybic i fungemii. Wynik dodatni nie wskazuje, która klasa grzybów może powodować zakażenie.

Test jest wskazany do wykonania przypuszczalnego rozpoznania zakażenia grzybiczego. Powinien być stosowany wraz z innymi procedurami diagnostycznymi, takimi jak posiew mikrobiologiczny, badanie histologiczne próbek biopsji i badanie radiologiczne.

<p>Uwaga – Zaleca się przekazanie tych informacji lekarzowi zlecającemu badanie:</p> <p>Test Fungitell nie wykrywa poszczególnych gatunków grzybów takich jak rodzina <i>Cryptococcus</i> (9), które produkują bardzo małe stężenia (1→3)-β-D-Glukanu. Ponadto test nie wykrywa klasy sprzężniaków (Zygomycetes) takich jak <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> i <i>Rhizopus</i> (17), o których nie wiadomo, czy produkują (1→3)-β-D-Glukanu. Ponadto, faza drożdżakowa <i>Blastomyces dermatitidis</i> produkuje niewielkie ilości (1→3)-β-D-Glukanu, których test może nie wykrywać (18).</p> <p>Podczas przekazywania wyników testu na obecność glukanu należy przekazać powyższe informacje.</p>

STRZECZENIE I WYJAŚNIENIE

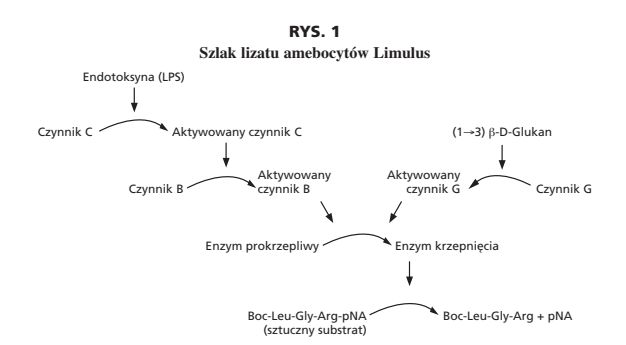
Wzrasta częstość zakażeń grzybiczych zarówno patogenami pierwotnymi jak i oportuni- stycznymi, szczególnie u pacjentów o obniżonej odporności (2, 3, 4). Inwazyjne grzybice, jako zakażenia oportunistyczne występują często u pacjentów z hematologicznymi nowotworami złośliwymi i AIDS i stanowią rosnącą liczbę zakażeń w warunkach szpitalnych, szczególnie wśród biorców przeszczepów i innych pacjentów leczonych lekami immunosupre- syjnymi (1,4). Wiele chorób grzybiczych jest powodowanych wdychaniem sporów grzybów pierwotnie pochodzących z ziemi, szczątków roślinnych, układów klimatyzacji i/lub narażonych powierzchni. Niektóre grzyby oportunistyczne są obecne w/na ludzkiej skórze, w przewodzie pokarmowym i na błonach śluzowych (7). Rozpoznanie inwazyjnych grzybic i fungemii oparte jest zwykle na nieswoistej technice diagnostycznej lub radiologicznej.

Do powszechnych pierwotnych ludzkich grzybów chorobotwórczych należy *Candida* spp. i *Aspergillus* spp. Do oportunistycznych grzybów chorobotwórczych należą: *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* i *Pneumocystis carinii*. Produkowany przez te i inne organizmy (1→3)-β -D-Glukan może być wykrywany za pomocą testu Fungitell (4,5, 16).

ZASADA TESTU

Test Fungitell mierzy stężenie (1→3)-β-D-Glukanu. Test opiera się na modyfikacji szlaku lizatu amebocytów *Limulus* (LAL) (8-11), rys. 1. Odczynnik testu Fungitell został zmodyfikowany w celu wyeliminowania czynnika C i w ten sposób reaguje wyłącznie z (1→3)-β-D-Glukanem, za pośrednictwem strony szlaku czynnika G.

(1→3)-β-D-Glukan aktywuje czynnik G, zymogen proteazy serynowej. Aktywowany czynnik G powoduje zamianę nieaktywnego enzymu prokrzepliwego w aktywny enzym krzepnięcia, który z kolei przecina pNA z substratu chromogenego peptydu (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) tworząc chromofor pochłaniający światło przy długości fali 405 nm. Opisany poniżej test kinetyczny Fungitell opiera się na oznaczeniu wzrostu odsetka gęstości optycznej powodowanej przez próbkę. Odsetek ten jest interpretowany w porównaniu do krzywej wzorcowej w celu określenia szacunkowego stężenia (1→3)-β-D-Glukanu w próbce.



MATERIAŁY DOSTARCZONE WRAZ Z ZESTAWEM FUNGITELL

Zestaw Fungitell jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce *in vitro*. Poniższe materiały dostarczone wraz z każdym zestawem wystarczają na wykonanie testów w 110 studzienkach na dwóch mikropłytkach (po 55 studzienke w każdej).

- Odczynnik Fungitell®, liofilizowany LAL swoisty dla (1→3)-β -D-Glukanu (dwie fiołki)
- Pyrosol bufor do odtwarzania postaci pierwotnej, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (dwie fiołki)
- Wzorec glukanu, liofilizowany konglomerat i obojętny wkład z zawartością (1→3)-β -D-Glukanu podaną na etykietce (dwie fiołki)
- Woda o czystości odczynnika (RGW) (dwie butelki)
- Pyropłytki: Nieoptylzone mikropłytki o płaskim dnie z 96 studzienkami z nakrywkami, nie zawierające zakłócających glukanów (dwie)
- KCl 1,2 M (jedna fiołka)
- KOH 0,25 M (jedna fiołka)

Wszystkie powyższe materiały oprócz wzorca nie zawierają zakłócających stężeń (1→3)-β -D-Glukanu.

- MATERIAŁY WYMAGANE (NIE ZNAJDUJĄCE SIĘ W ZESTAWIE)**
- Żaden materiał nie może zawierać zakłócających glukanów. Szkło laboratoryjne musi być pozbawione pirogenów w wysokiej temperaturze, w minimum 235°C przez 7 godzin (lub w zwalidowanych równorzędnych warunkach), aby mogło nadawać się do użycia.
- Końcówki pipety* (250 µl – nr kat. PPT25, 1000 µl – nr kat. PPT10)
 - Pipetory umożliwiające podanie objętości 5-25 µl i 100-1000 µl
 - Pipetor krokowy, z mikrokońcówkami, umożliwiającymi podawanie 100 µl
 - Próbówki* do przygotowania standardowej serii i łącznych odczynników do przygotowania surowicy (ze szkła borokrzemowego 13 x 100 mm – nr kat. TB013)
 - Czynnik płytek z inkubacją (37°C) umożliwiający monitorowanie w dwóch długościach fal, przy 405 i 490 nm, z dynamicznym zakresem przynajmniej do 2,0 jednostek absorbancji, połączony z odpowiednim komputerowym oprogramowaniem testów kinetycznych.
 - Sterylna, nie zawierająca glukanu próbówki do przechowywania z zakrętkami do podzielenia próbek na równe objętości (większość probówek z atestem RNase, DNase, i niezawierających pirogenów nie zawiera zakłócających stężeń (1→3)-β -D-Glukanu).
 - Parafilm®

* Te produkty dostarczane przez Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), mają atest potwierdzający, że nie zawierają zakłócających glukanów.

Uwaga – pipety szklane z bawelnianymi zatyczkami są potencjalnym źródłem skażenia glukanami.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Niniejszy produkt jest przeznaczony wyłącznie do DIAGNOSTYKI IN VITRO.

<p>Test Fungitell wymaga rygorystycznego przestrzegania techniki i otoczenia testu. Dokładne szkolenie techników laboratoryjnych w zakresie metody testu i unikania skażenia ma podstawowe znaczenie dla prawidłowego wyniku testu.</p>

- Gatunki nie wykrywane przez test Fungitell. Określone gatunki grzybów produkują bardzo małe stężenia (1→3)-β -D-Glukanu i zwykle nie są wykrywane przez test Fungitell. Dotyczy to między innymi rodziny *Cryptococcus* (14,16) oraz sprzężniaków takich jak *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus* (16,17). Ponadto *Blastomyces dermatitidis* w fazie drożdżakowej produkuje niewielkie ilości (1→3)-β-D-Glukanu i w związku z tym zwykle nie jest wykrywany przez test Fungitell (18).
- Nie pipetować materiałów ustami. W pomieszczeniu przeznaczonym do pracy z próbkami lub odczynnikami zestawu nie wolno palić papierosów, jeść ani pić.
- Należy przygotować czyste pomieszczenie do wykonywania testu. Stosować materiały i odczynniki z atestem potwierdzającym niezawieranie zakłócających stężeń (1→3)-β -D-Glukanu. Należy pamiętać, że glukan oraz skażenia grzybami z ciała ludzkiego, ubrań, pojemników, wody i unoszące się w kurzu mogą powodować zakłócenia test Fungitell.
- Nie wolno stosować odczynników po upływie podanego terminu ważności.

- Odbarwione lub mętne próbki takie jak próbki silnie zhemolizowane, lipemiczne lub zawierające duże stężenia bilirubiny mogą powodować zakłócenia. W przypadku badania, wyniki testu należy badać pod kątem obecności zakłóceń optycznych i/lub nietypowych schematów kinetycznych.
- Podczas postępowania z próbkami pacjentów należy stosować odpowiednie ubrania ochronne i rękawiczki bezpyłowe.
- Surowica pacjentów hemodializowanych może zawierać większe stężenia (1→3)-β-D-glukanu, w przypadku stosowania określonych celulozowych membran do dializy (13). Hemodializa z wykorzystaniem membran z trioctanu celulozy lub z polimetyloakrylanu metylu nie ma wpływu na test.
- Gaziki chirurgiczne i gąbki mogą zawierać duże stężenia (1→3)-β-D-glukanu, które mogą przyczyniać się do przemieszających dodatnich wyników testu Fungitell w związku ze skażeniem, co obserwowano u pacjentów po zabiegach chirurgicznych (6).
- Nie używać zestawów z uszkodzoną zawartością.
- Materiały wystawione na działanie potencjalnie skażonych (zawierających drobnoustroje chorobotwórcze) płynów muszą być usuwane w sposób zgodny z lokalnymi przepisami.

Przechowywanie odczynników

Wszystkie odczynniki gotowe do użycia przechowywać w temperaturze od +2 do + 8 °C w ciemnym miejscu. Po odtworzeniu postaci pierwotnej odczynnik Fungitell należy przechowywać w temperaturze 2-8 °C i zużyć w ciągu 2 godzin. Alternatywnie po odtworzeniu postaci pierwotnej odczynnik Fungitell można przechowywać w temperaturze -20 °C do 20 dni, rozmrażać jeden raz i zużyć.

Postępowanie z próbkami

- Pobieranie próbek: Próbkı surowicy należy pobierać do sterylnych probówek próżniowych (z czerwonym korkiem) lub do probówek z separatorem surowicy (SST) i pozostawić do wyprzednięcia. Następnie surowica jest oddzielona od skrzepu i dekantowana do odpowiedniego pojemnika nie zawierającego zakłócających stężeń (1→3)-β-D-glukanu.
- Przechowywanie próbek: Próbkı surowicy można przechowywać przed testem w temperaturze 2-8°C lub zamrożone w temperaturze -20° lub niższej.
- Oznaczenie próbek: Próbkı należy wyraźnie oznaczać zgodnie z zatwierdzoną praktyką danej placówki.

PROCEDURA

Uwaga: Ustawienia mogą być różne w zależności od różnych instrumentów i oprogramowań. Generalnie obowiązują poniższe instrukcje: Ustawić program czytnika płytek na gromadzenie danych w trybie Vmean. Sprawdzić w podręczniku oprogramowania prawidłowe ustawienia, aby zapewnić, że obliczona wartość jest średnią wartością zmiany gęstości optycznej dla wszystkich zgromadzonych punktów danych. Odstęp pomiędzy „odczytami” gęstości optycznej powinien mieścić się w granicach 15-30 sekund. Ustawienia długości fal programu powinny być 405 nm minus tło przy 490 nm. Jeśli nie jest dostępny odczyt w dwóch długościach fal, wykonać odczyt w 405 nm. Temperatura inkubacji powinna być ustawiona na 37°C. Przed rozpoczęciem odczytu należy wykonać wytrąsanie płytki przez 5 – 10 sekund. Ustawienie dopasowania krzywej powinno być „liniowe/liniowe” lub równorzędne. Odczyt powinien następować bez fazy opóźnienia.

- Przygotowanie wzorca glukanu dostarczonego w zestawie.
 - Rozpuścić jedną fiołkę glukanu z objętością RGW podaną na fiołce, aby otrzymać 100 pg/ml roztworu. Mieszać co najmniej przez 30 sekund w celu otrzymania ponownej zawiesiny (roztwór 1). Roztwór glukanu należy przechowywać w temperaturze 2-8°C i zużyć w ciągu trzech dni. Poniższe kroki ilustrują przykład planu przygotowania krzywej wzorcowej.
 - Przygotować wzorec 50 pg/ml mieszając 500 µl RGW i 500 µl roztworu 1 w probówce nie zawierającej glukanu (roztwór 2). Mieszać przez przynajmniej 10 sekund.
 - Przygotować wzorec 25 pg/ml mieszając 500 µl RGW i 500 µl roztworu 2 w probówce nie zawierającej glukanu (roztwór 3). Mieszać przez przynajmniej 10 sekund.
 - Przygotować wzorec 12,5 pg/ml mieszając 500 µl RGW i 500 µl roztworu 3 w probówce nie zawierającej glukanu (roztwór 4). Mieszać przez przynajmniej 10 sekund.
 - Przygotować wzorec 6,25 pg/ml mieszając 500 µl RGW i 500 µl roztworu 4 w probówce nie zawierającej glukanu (roztwór 5). Mieszać przez przynajmniej 10 sekund.
- Przygotowanie odczynnika do przygotowania surowicy. Alkaliczny odczynnik do przygotowania surowicy zamienia glukany o potrójnej spirali w glukany jednoniciowe (10, 11), które są bardziej reaktywne w analizie. Duże pH również inaktywuje proteazy serynowe i inhibitory proteazy serynowej w surowicy, które mogą powodować odpowiednio fałszywie dodatni lub fałszywie ujemny wynik (20).
 - Przygotować odczynnik do przygotowania surowicy łącząc jednakowe objętości 0,25 M KOH i 1,2 M KCl i dobrze wymieszać. Zalecane objętości wynoszą maksymalnie do 900 µl każdego odczynnika umożliwiając otrzymanie dwóch preparatów. Zakryć fiołki folią Parafilm do wykorzystania z drugą płytką. Zakryć fiołkę folią Parafilm wykorzystując stronę folii Parafilm skierowaną do warstwy papierowej.

- Uwaga: Podczas rysowania krzywej wzorcowej, należy pomnożyć stężenie wzorców przez pięć, aby zakres wyniósł od 500 do 31 pg/ml. Wprowadzić wzorce do ustawień programu odpowiednio jako 500, 250, 125, 62,5 i 31 pg/ml.

Objętość wzorca w teście wynosi 25 µl na studzienkę lub jest pięciokrotną objętością próbki surowicy. Mikropłytką z wzorcami (St), kontrolami ujemnymi (Neg) i 21 nieznanymi próbami (Uk), każda zbadana w dwóch powtórzeniach, jest przygotowana następująco:

	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												

Uwaga 1: Mogą być wykorzystane zewnętrzne studzienki, jeśli udowodniono, że działanie zewnętrznych studzienek jest porównywalne z wewnętrznymi studzienkami.

Uwaga 2: W celu uniknięcia przypadkowego skażenia należy wymienić osłonę mikropłytki po dodaniu próbki i odczynników do studzienek. Zdjąć osłonę przed umieszczeniem płytki w czytniku w celu uniknięcia zakłóceń optycznych spowodowanych kondensacją pary.

- Dodanie surowicy i odczynnika do przygotowania.
 - Rozpuścić zamrożone próbki surowicy w temperaturze pokojowej. Dokładnie wymieszać wszystkie próbki.
 - Przenieść 5 µl próbki surowicy do każdej wyznaczonej studzienki (Uk) przynajmniej w dwukrotnym powtórzeniu. Powtarzać dla każdej próbki surowicy.
 - Dodać 20 µl odczynnika do przygotowania surowicy do każdej studzienki zawierającej surowicę.
- Dodanie surowicy i odczynnika do przygotowania.
 - Wstrząsać płytkę przez 5 – 10 sekund, aby wymieszać zawartość studzienek (można wykorzystać funkcję mieszania czytnika płytek) a następnie inkubować przez 10 minut w temperaturze 37 °C w czytniku płytek z inkubacją.

- Odtworzenie odczynnika Fungitell.
 - Dodanie odczynnika Fungitell dodając 2,8 ml RGW a następnie 2,8 ml buforu Pyrosol do odtworzenia za pomocą pipetora 1000 µl. Zakryć fiołkę folią Parafilm wykorzystując stronę folii Parafilm skierowaną do warstwy papierowej. Delikatnie wirować fiołką w celu całkowitego rozpuszczenia – nie mieszać.
- Dodawanie kontroli ujemnej i wzorców glukanu. Po zakończeniu wstępnej inkubacji surowicy (krok 3. d), zdjąć płytkę z czytnika płytek z inkubacją i dodać na płytce wzorce i kontrole ujemne.
 - Dodać 25 µl RGW do studzienek G2 i G3.
 - Dodać 25 µl 6,25 pg/ml roztworu wzorcowego 5 do studzienek F2 i F3.
 - Dodać 25 µl 12,5 pg/ml roztworu wzorcowego 4 do studzienek E2 i E3.
 - Dodać 25 µl 25 pg/ml roztworu wzorcowego 3 do studzienek D2 i D3.
 - Dodać 25 µl 50 pg/ml roztworu wzorcowego 2 do studzienek C2 i C3.
 - Dodać 25 µl 100 pg/ml roztworu wzorcowego 1 do studzienek B2 i B3.
- Dodanie odczynnika Fungitell i procedura inkubacji płytki.
 - Dodać 100 µl odczynnika Fungitell do każdej studzienki (zawierających kontrole ujemne, wzorce i próbki) za pomocą pipetora krokowego.
 - Umieścić płytkę w czytniku mikropłytek (doprowadzono do temperatury 37°C) zakrytą nakrywką i wstrząsać przez 5-10 sekund. Odczytać płytkę bez nakrywki w długości fali 405 nm minus 490 nm przez 40 minut w temperaturze 37°C. Jeśli nie jest dostępne odjęcie tła (przy 490 nm), wówczas dopuszczalne jest odczytanie w długości fali 405 nm. Jeśli nie jest dostępna w czytniku funkcja wytrąsania, można wykorzystać zewnętrzną wytrząsarkę płytek.
 - Zebrać dane i analizowane w następujący sposób: Obliczyć średnią wielkość zmiany gęstości optycznej (jednostki miliabsorbancji/minutę) dla wszystkich punktów od 0 do 40 minut.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki testu Fungitell należy wykorzystywać jako pomoc w rozpoznaniu inwazyjnego zakażenia grzybiczego.Wyniki wyrażone w pg/ml surowicy mieszczą się w zakresie od niewykrywalnego (<31 pg/ml) do > 500 pg/ml i są drukowane przez program lub odczytywane z krzywej wzorcowej. Dokładne wartości ponad 500 pg/ml wymagają rozcieńczenia próbki w RGW i ponownego wykonania testu.

Laboratorium wykonujące test powinno poinformować lekarza zlecającego test, że test Fungitell nie wykrywa poszczególnych gatunków grzybów takich jak rodzina *Cryptococcus* (16,17), które produkują bardzo małe stężenia (1→3)-β-D-Glukanu. Ponadto test nie wykrywa klasy sprzątniaków (zygomycetes) takich jak *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus* (16,17), o których nie wiadomo, czy produkują (1→3)-β-D-Glukan. Podobnie gatunek *Blastomyces dermatitidis* w fazie drożdżakowej produkuje mało (1→3)-β-D-Glukanu i jest zwykle niewykrywany (18).

WYNIK UJEMNY

Wartości (1→3)-β-D-Glukanu < 60 pg/ml są interpretowane jako wyniki ujemne.

WYNIK DODATNI

Wartości >80 pg/ml są interpretowane jako wynik dodatni. Wynik dodatni oznacza wykrycie (1→3)- β-D-glukanu. Wynik dodatni nie określa obecności choroby i należy go wykorzystywać wraz z innymi danymi klinicznymi do ustalenia rozpoznania.

WYNIK NIEOKREŚLONY

Wartości od 60 do 79 pg/ml sugerują możliwość zakażenia grzybiczego. Zalecane jest pobranie dodatkowych próbek i wykonanie badań surowicy. Częste pobieranie próbek i wykonywanie testów poprawia użyteczność rozpoznania.

KONTROLA JAKOŚCI

- Współczynnik korelacji (r) krzywej wzorcowej (liniowy kontra liniowy) powinien wynosić > 0,980.
- Studzienki z (25 ml RGW) są kontrolami ujemnymi. Kontrole ujemne powinny mieć rzeczywiste wartości wskaźnika gęstości optycznej (Vmean) poniżej 50% najniższego wzorca. Jeśli tak nie jest, należy powtórzyć test przy zastosowaniu wszystkich nowych odczynników.
- Postępowanie z próbkami problematycznymi. Jeśli analityk zauważy próbki mętne lub odbarwione, takie jak w przypadku próbek silnie zhemolizowanych lub silnie lipemicznych lub zawierających nadmierne stężenie bilirubiny, wówczas próbki należy rozcieńczyć RGW i ponownie zbadać. Należy uwzględnić rozcieńczenie w raporcie wyników poprzez przemnożenie wyniku przez współczynnik rozcieńczenia. Zwykle współczynnik rozcieńczenia jest wprowadzany do konfiguracji programu dla próbki i korekcja następuje automatycznie.
- Próbki kontrolne, graniczne i stężenia silnie dodatnie mogą być wykonywane w celu sprawdzenia, czy odczynniki i test działają prawidłowo. Każdy użytkownik testu powinien ustalić program kontroli, aby zapewnić biegłość w wykonywaniu testu.

OGRANICZENIA PROCEDURY

- Lokalizacja tkanki z zakażeniem grzybiczym (10), otorbieenie i ilość wytwarzanego (1→3)-β-D—Glukanu przez określone grzyby może mieć wpływ na stężenie w surowicy tego analitu. Ograniczenie możliwości wprowadzania (1→3)-β-D-Glukanu do krwiobiegu może zmniejszyć możliwość wykrycia określonych zakażeń grzybiczych. *Cryptococcus* spp. produkuje małe ilości (1→3)-β-D-Glukanu (11) w związku z otorbieniem komórki. Nie wiadomo, czy sprzątniaki obejmujące *Absidia*, *Mucor* spp. i *Rhizopus* spp (16,17), produkują (1→3)-β-D-Glukan (16,17). Gatunek *Blastomyces dermatitidis* w fazie drożdżakowej produkuje mało (1→3)-β-D-Glukanu i wynik testu jest zwykle ujemny (18).
- U niektórych osób występują podwyższone stężenia (1→3)-β-D-glukanu, które mieszczą się w zakresie wyniku nieokreślonego. W takich przypadkach zaleca się dodatkowe badanie.
- Częstość wykonywania badań zależy od względnego ryzyka zakażenia grzybiczego. W przypadku pacjentów z grupy ryzyka zaleca się pobieranie próbek przynajmniej dwa-trzy razy w tygodniu.
- Wyniki dodatnie stwierdzano u pacjentów hemodializowanych (12,13), pacjentów leczonych określonymi frakcjonowanymi produktami krwi takimi jak albumina surowicy i immunoglobuliny (19) oraz w próbkach i u osób narażonych na gaziki zawierające glukany. Po narażeniu podczas zabiegu chirurgicznego na kontakt z gąbkami i gazikami zawierającymi (1→3)-β-D-glukan przywrócenie stężeń początkowych (1→3)-β-D-glukanu w surowicy u pacjentów wymaga 3 – 4 dni (6).. Należy to uwzględnić w harmonogramie pobierania próbek od pacjentów po zabiegach chirurgicznych.
- Próbki uzyskiwane za pomocą pęćnika do pobrania próbki z pięty lub opuszki palca są niedopuszczalne, ponieważ wykazano, że gazik z alkoholem do przygotowania miejsca (i potencjalnie krwi zebranej z powierzchni skóry) powoduje skażenie próbek.
- Stężenia testu ustalono u pacjentów dorosłych. Prawidłowe stężenia u niemowląt i dzieci są zbliżone do poziomów u dorosłych (21). Brak danych dla noworodków i niemowląt w wieku poniżej sześciu miesięcy.
- Zakres testu wynosi od 31 pg/ml do 500 pg/ml. Wartości poniżej 31 pg/ml są określane jako < 31 pg/ml. Wartości >500 pg/ml są określane jako > 500 pg/ml.

SUBSTANCJE ZAKŁÓCAJĄCE

Poniższe warunki mogą zakłócać dokładny wynik testu Fungitell:

- Hemoliza
- Zmętnienie próbki spowodowane lipemią
- Obecność widocznej bilirubiny
- Mętna surowica

OCZEKIWANE WARTOŚCI

Wartości stężeń glukanu są podwyższone w różnych zakażeniach grzybiczych. W przypadku obecności objawów przedmiotowych i podmiotowych przy stężeniu 80 pg/ml lub wyższym przewidywana wartość wyniku dodatniego w zakresie zakażenia grzybiczego waha się od 74.4 do 91,7% (Tabela 2). W przypadku braku objawów podmiotowych i przedmiotowych przy stężeniu poniżej 60 pg/ml, przewidywany wynik ujemny waha się od 65,1% do 85,1%.

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Test porównawczy

Przeprowadzono wieloosrodkowe, prospektywne badanie mające na celu walidację charakterystyki działania testu Fungitell. Test porównywano z innymi standardowymi metodami (tj. posiew krwi, badanie histopatologiczne próbki biopsyjnej i objawy radiologiczne) badania grzybic i fungemii.

W badaniu uczestniczyło trzstu pięćdziesięciu dziewięciu (359) pacjentów. Od każdego pacjenta pobrano pojedynczą próbkę. W grupie małego ryzyka znajdowały się osoby zdrowe i pacjenci w ośrodkach badawczych przyjęci do szpitala z innych powodów niż zakażenia grzybicze. Rekrutację pacjentów przeprowadzono w sześciu placówkach służby zdrowia na terenie Stanów Zjednoczonych. Cztery z tych placówek wykonały test i zbadały łącznie 285 próbek. Firma ACC zbadała łącznie 359 próbek dwukrotnie, ale wykorzystala tylko drugą serię wyników do określenia działania testu. Wyniki drugiej serii nie różniły się statystycznie od pierwszej serii.

Czułość dla całej populacji pacjentów (359) łącznie z *Cryptococcus* wynosiła 65,0% (Przedział ufności (C.I.) 60,1 – 70,0%). Swoistość wyniosła 81,1% (77,1 – 85,2 % C.I.) (Tabela 1). Zakres czułości wyników z czterech ośrodków wykonujących test wynosił od 50,0% do 66,7%. Zakres swoistości testu wahał się od 70,0% do 93,0% dla 285 zbadanych próbek (Tabela 2).

Tabela 1 Wyniki testu w firmie ACC przy stężeniu granicznym 60-80 pg/ml według ośrodków									
Ośrodek	Potwierdzone/prawdopodobne Czułość >=80pg/ml			Swoistość <60pg/ml			Niejednoznaczny 60<=X<80	Łącznie	
	Dodatkil/ klinicznie dodatni	Czułość	Dodatkia wartość przewidywalna	Ujemny/ klinicznie ujemny	Swoistość	Ujemna wartość przewidywalna			
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	Nie dotyczy	0/0	Nie dotyczy	0,0	0	1	
Łącznie*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359	

* Wraz z jedną próbką z ośrodka 6.

Po porównaniu wyników uzyskanych przez firmę ACC (359 próbek) i ośrodki kliniczne (285 próbek) z rozpoznaniem klinicznym czułość wyniosła 64,3% (58,8% - 69,9% CI) w przypadku ACC i 61,5% (55,9% - 67,2% CI) w przypadku ośrodków. Swoistość wynosi 86,6% (82,7% - 90,6% CI) w przypadku ACC w porównaniu do 79,6% (74,9% - 84,3% CI) w przypadku ośrodków (Tabela 2).

Tabela 2 Wyniki testu w ośrodkach przy stężeniu granicznym 60-80 pg/ml według ośrodków									
Ośrodek	Potwierdzone/prawdopodobne Czułość >=80pg/ml			Swoistość <60pg/ml			Niejednoznaczny 60<=X<80	Łącznie	
	Dodatkil/ klinicznie dodatni	Czułość	Dodatkia wartość przewidywalna	Ujemny/ klinicznie ujemny	Swoistość	Ujemna wartość przewidywalna			
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 *									
Łącznie, ośrodki	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	

* Nie ośrodek, w którym wykonywano testy

KANDYDOZA

W badaniu prospektywnym uczestniczyło 107 pacjentów z dodatnim rozpoznaniem kandydozy. Dodatni wynik testu Fungitell otrzymano w przypadku 83 pacjentów na 107.

Firmie Associates of Cape Cod przekazano sto siedemdziesiąt pięć próbek bibliotecznych (banku danych) kandydozy. Dodatni wynik testu otrzymano w przypadku 145 na 175 próbek.

ASPERGILOZA

Łącznie 10 pacjentów miało dodatni wynik na obecność aspergilozy. Dodatni wynik testu otrzymano w przypadku 8 na 10 próbek.

FUZARIOZA

Trzech pacjentów miało wynik dodatni na obecność fuzariozy. Dodatni wynik testu otrzymano w przypadku 2 na 3 próbki.

LECZENIE PRZECIWRZYBICZE

Leczenie lub brak leczenia przeciwgrzybiczego nie wywarło statystycznie znamiennego wpływu na czułość testu. U 118 pacjentów potwierdzono inwazyjne zakażenie grzybicze i zastosowano leczenie przeciwgrzybicze. U 82 potwierdzono dodatni wynik za pomocą testu (czułość, 69,5%; 61,2% - 77,8% CI). Dodatkowo dodatni wynik potwierdzono w przypadku dwudziestu czterech (24) pacjentów, którzy nie byli leżeni. U 18 potwierdzono dodatni wynik za pomocą testu (czułość, 75%; 57,7% - 92,3% CI).

SWOISTOŚĆ

Łącznie 170 uczestników miało wynik ujemny w zakresie zakażenia grzybiczego i były to pozornie zdrowe osoby. Swoistość przy użyciu testu wynosiła 86,5% (82,8% - 90,1% C.I.). Po włączeniu dodatkowych 26 uczestników z ujemnym wynikiem w kierunku zakażenia grzybiczego, lecz z innymi chorobami swoistość wyniosła 81,1% (77,1 – 85,2 % C.I.).

KORELACJE TESTU

Cztery z placówek klinicznych zbadały łącznie 285 próbek. Wyniki testów ośrodków korelowały ilościowo w 96,4% z wynikami Associates of Cape Cod. Korelacje wyników Associates of Cape Cod z różnymi ośrodkami wykonującymi testy wahały się od 90,6 do 99,2%.

PRECYZJA

Podczas badań precyzji zbadano dziesięć (10) różnych próbek w trzech ośrodkach badawczych w trzech różnych dniach. Różnica w ramach jednego testu wynosiła od 0,9 do 28,9%. Różnica pomiędzy testami wynosiła od 3,9 do 23,8%. Cztery (4) ujemne próbki wyłączono z obu analiz.












- 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-galucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 1995: 345:17-20.
- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjijan, 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-galucan (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* ameobocyte 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-galucan 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.
- Giroud, 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.

PIŚMIENICTWO DODATKOWE, NIE UWZGLĘDNIONE W PRZYPISACH

- 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.

OBJAŚNIENIE SYMBOLI

	Termin ważności
	Zawiera ilość materiałów wystarczającą do <=> badań
	Numer serii
	Urządzenie diagnostyczne in vitro
	Nr katalogowy
	Temperatury graniczne
	Wytwórca
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Autoryzowany przedstawiciel
	Oznaczenie znakiem CE
	Associates of Cape Cod® International, Inc. Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Wielka Brytania