

Analýza látky (1→3)-β-D-glukán v sére	
FUNGITELL®	
Návod na použitie	
	
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED	<p>Telefón: +1 508 540 3444</p> <p>Bezplatná telefónna linka: +1 888 395 2221</p> <p>Fax: +1 508 540 8680</p> <p>Technická podpora: +1 800 848 3248</p> <p>Oddelenie služieb pre zákazníkov: +1 800 525 8378</p>
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536	<p>42</p> <p></p>
PN001268-sk	Rev. 000. Posledná revízia december 2007.

ÚČEL POUŽITIA

Analýza Fungitell je kolorimetrická analýza založená na aktivácii zymogénov proteáz, ktorá sa môže použiť pre kvalitatívnu detekciu (1→3)-β-D-glukánu v sére pacientov so symptómami invazívnej hubovej infekcie (alebo pacientov so zdravotným stavom, v dôsledku ktorého sú títo pacienti náchylní na hubovú infekciu). Koncentrácia (1→3)-β-D-glukánu (hlavná zložka bunkových stien rôznych klinicky významných húb) sa môže použiť ako pomôcka pri diagnostike hľboko uložených mykóz a fungémií. Pozitívny výsledok neuvádza, ktoré typy húb môžu spôsobovať infekciu.

Test je určený na predikatívnu diagnostiku hubovej infekcie. Test sa musí používať spolu s ďalšími diagnostickými postupmi, ako napríklad mikrobiologickou kultúrou, histologickým vyšetroním bioptických vzoriek a rádiologickým vyšetroním.

Dôležité – odporúčame, aby ste odosielajúcemu lekárovi poskytli tieto informácie:
Analýza Fungitell neslúži na detekciu niektorých typov húb, ako napríklad patogénnej kvasiniek <i>Cryptococcus</i> (9), ktorá produkuje veľmi nízke úrovne látky (1→3)-β-D-glukán. Táto analýza neslúži ani na detekciu zygomycetov, napríklad <i>Absidia</i> , <i>Mucor</i> a <i>Rhizopus</i> (17), o ktorých nie je známe, že by produkovali látku (1→3)-β-D-glukán. Okrem uvedeného kvasinková fáza <i>Blastomyces dermatitidis</i> produkuje iba malé množstvo látky (1→3)-β-D-glukán a analýza ju nemusí detegovať (18).
Pri vykazovaní výsledkov testu analýzy glukánu zahrňte aj toto vyjadrenie.

SÚHRN A VYSVETLENIE

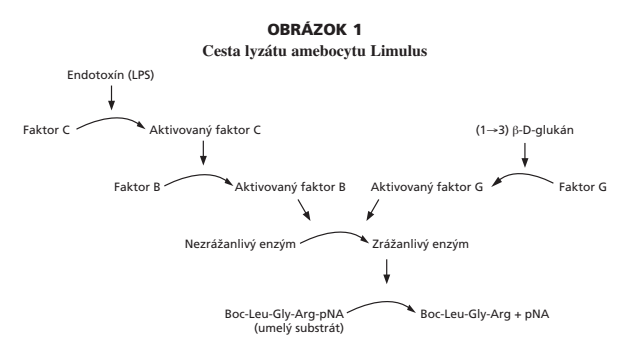
Výskyt hubových infekcií spôsobených primárnymi a oportunistickými patogénmi, najmä u pacientov s oslabenou imunitou, narastá (2,3,4). Invazívne hubové ochorenia, ako oportunistické infekcie, sú časté v rámci hematologických malignít a u pacientov s ochorením AIDS, a sú zodpovedné za narastajúci počet nemocničných infekcií, najmä v prípade príjemcov transplantovaných orgánov a iných pacientov podrobujúcich sa imunosupresívnej liečbe (1,4). Mnohé hubové choroby sa získajú vdychovaním hubových spór pochádzajúcich z pôdy, rastlinných nánosov, klimatickej alebo z exponovaných povrchov. Niektoré oportunistické huby sú prítomné na alebo v pokožke človeka, črevnom trakte a v slizniciach (7). Diagnostika invazívnych mykóz a fungémií je spravidla založená na nešpecifických diagnostických alebo rádiologických postupoch.

Spoločnými ľudskými hubovými patogénmi sú *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. Oportunistické hubové patogény zahŕňajú *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* a *Pneumocystis carinii*. Látka (1→3)-β-D-glukán produkovaná týmito organizmami (a inými organizmami) sa dá detegovať pomocou analýzy Fungitell (4,5, 16).

PRINCÍPY PROCEDÚRY

Analýza Fungitell meria hladiny (1→3)-β-D-glukánu. Táto analýza je založená na modifikácii cesty lyzátu amebocytu z *Limulus polyphemus* (LAL) (8-11), obr. 1. Reagencia Fungitell bola modifikovaná s cieľom eliminácie faktora C a preto reaguje iba s (1→3)-β-D-glukánom prostredníctvom tej časti cesty, ktorá je iniciovaná faktorom G.

(1→3)-β-D-glukán aktivuje faktor G zymogén serínovej proteázy. Aktivovaný faktor G mení neaktívny nezrážanlivý enzým na aktívny zrážanlivý enzým, ktorý odštiepením pNA z chromogénneho peptidového substrátu Boc-Leu-Gly-Arg-pNA vytvára chromofor absorbujúci pri vlnovej dĺžke 405 nm. Nižšie popísaná kinetická analýza Fungitell je založená na meraní rýchlosti nárastu absorbcie produkovanej vzorkou. Táto rýchlosť sa porovnáva s rýchlosťou produkovanou štandardami kalibračnej krivky, aby sa vypočítala koncentrácia (1→3)-β-D-glukánu vo vzorke.



MATERIÁLY DODÁVANÉ SO SÚPRAVOU FUNGITELL

Súprava Fungitell je určená na diagnostické použitie *in vitro*. Nasledujúce materiály sú súčasťou Fungitell setu a ich objemové množstvo postačuje na 110 analýz na dvoch mikrotitračných doštičkách (55 jamôk na každej doštičke):

- Reagencia Fungitell®, lyofilizovaný LAL špecifický pre (1→3)-β-D-glukán (dve fľaštičky)
- Pyrosol, pufr pre rekonštitúciu Fungitell reagencie, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (dve fľaštičky)
- Štandard, lyofilizovaný glukán (pachyman) s inertným plnidlom - obsah (1→3)-β-D-glukánu je uvedený na štítku (dve fľaštičky)
- Voda reagenčnej čistoty (RGW) (dve fľaše)
- Pyroplate: mikrotitračné doštičky s plochým dnom a viečkom, 96 jamiek bez povrchovej úpravy, bez rušivých glukánov (dve)
- KCl 1,2 M (jedna liekovka)
- KOH 0,25 M (jedna liekovka)

Žiadny s vyššie uvedených materiálov (s výnimkou štandardu) neobsahuje rušivé úrovne (1→3)-β-D-glukánu.

VYŽADOVANÉ MATERIÁLY, KTORÉ SA NEDODÁVAJU

Žiadny materiál nesmie obsahovať rušivé hladiny glukánu. Sklenené nádoby musia byť depyrogenizované horúcim vzduchom pri teplote 235 °C po dobu 7 hodín (alebo iným validovaným spôsobom), aby boli vhodné na použitie.

- Špičky na pipety* (250 µl – kat. č. PPT25, 1 000 µl – kat. č. PPT10)
- Nastaviteľné digitálne mikropipety pre objemy 5 – 25 µl a 100 – 1 000 µl
- Opakovateľná nastaviteľná pipeta s dávkovačom pre 100 µl
- Skúmavky* na prípravu kalibračnej krivky a na prípravu reagencie pre úpravu séra. (13 x 100 mm, borokremičité sklo, kat. č. TB013)
- Mikrodoštičkový inkubačný reader (pri 37 °C) schopný merať vzorku pri dvoch vlnových dĺžkach (405 a 490 nm) s dynamickým rozsahom najmenej do 2 Abs. Vhodný počítačový softvér umožňujúci kinetickú analýzu.
- Sterilné skladovacie skúmavky bez obsahu glukánu, so šrubovacím uzáverom, ktoré slúžia na odber pomerných častí vzoriek (väčšina skúmaviek certifikovaná na neprítomnosť RNAsy, DNAsy a pyrogénu tiež neobsahuje rušivé hladiny (1→3)-β-D-glukánu).
- Parafilm®

*Tieto produkty, ktoré dodáva spoločnosť Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), neobsahujú rušivé glukány.

Upozornenie: sklenené pipety s vatovými zátkami predstavujú potenciálny zdroj glukánovej kontaminácie.

UPOZORNENIA A PREVENTÍVNE OPATRENIA

Tento produkt je určený na DIAGNOSTICKÉ POUŽITIE IN VITRO.

Analýza Fungitell vyžaduje dôsledné dodržiavanie správnej laboratórnej techniky a udržiavanie čistého laboratórneho prostredia. Dôkladné zaškolenie personálu v metodike stanovenia a v zamedzení kontaminácie je kriticky dôležité pre reprodukovateľnosť testu.

- Druhy, ktoré analýza Fungitell nedokáže detegovať. Niektoré druhy húb produkujú len veľmi nízke hladiny (1→3)-β-D-glukánu a analýza Fungitell ich spravidla nedokáže detegovať. Ide o rod *Cryptococcus* (14,16) a o zygomycety *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus* (16,17). Okrem toho rod *Blastomyces dermatitidis* v kvasinkovej forme produkuje nízke hladiny (1→3)-β-D-glukánu a preto ho analýza Fungitell spravidla nedokáže detegovať (18).
- Nepipetujte žiadny materiál ústami. V mieste manipulácie so vzorkami alebo reagenciami neľajte, nejedzte ani nepite.
- Vytvorte si čisté prostredie, v ktorom sa bude analýza vykonávať. Používajte materiály a reagencie, ktoré sú certifikované na neprítomnosť rušivých (1→3)-β-D-glukánov. Pamätajte, že glukánová, ako aj hubová kontaminácia z ľudského tela, odevov, nádob, vody a prachových častíc zo vzduchu môže narúšať analýzu Fungitell.
- Nepoužívajte reagencie po dátume expirácie.

- Pochybné a kalné vzorky (napr. vzorky, ktoré sú výrazne hemolyzované, lipemické alebo obsahujú prílišné množstvo bilirubínu) môžu spôsobovať rušenie. Pri hodnotení výsledkov testov takýchto vzoriek by sa malo preskúmať, či mohlo/nemohlo dôjsť k optickému rušeniu a/alebo k výskytu neobvyklých kinetických trendov.
- Počas manipulácie so vzorkami pacienta používajte vhodný ochranný odev a rukavice bez pádru.
- Sérum pacientov podstupujúcich hemodialýzu môže obsahovať vysoké úrovne (1→3)-β-D-glukánu, ak sa na nich používaly niektoré celulózové dialytické membrány (13). Hemodialýzy s celulózovými triacetátovými membránami alebo polymetyl-metakrylátovými membránami neovplyvňujú analýzu.
- Chirurgické gázy a tampóny môžu obsahovať vysoké hladiny (1→3)-β-D-glukánu, ktoré môžu prispievať k prechodne pozitívnym výsledkom spôsobených kontamináciou (ako bolo dokázané u po-operovaných pacientov (6))
- Súpravy s poškodeným obsahom sa nesmú používať.
- Materiály vystavené pôsobeniu potenciálne kontaminovaných tekutín (ktoré obsahujú patogény) sa musia zlikvidovať v súlade s miestnymi nariadeniami.

Skladovanie reagencie

Všetky reagencie skladujte v pôvodných obaloch pri teplote 2 – 8 °C na tmavom mieste. Prípravené reagencia Fungitell sa musí skladovať pri teplote 2 – 8 °C a musí sa použiť do 2 hodín. Prípravené reagenciu Fungitell možno uchovávať aj zmrazenú pri –20 °C po dobu 20 dní a použiť iba raz rozmrazenú.

Manipulácia so vzorkami

- Odber vzoriek: sérové vzorky sa musia odoberať do sterilných vákuových skúmaviek (červené uzávery) alebo do sérových separačných skúmaviek (SST), a musia sa nechať zraziť. Sérum sa potom oddeli od zrazeniny a zleje sa do vhodnej skumavky, ktorá neobsahuje (1→3)-β-D-glukány.
- Skladovanie vzoriek: sérové vzorky možno pred analýzou skladovať pri teplote 2 – 8 °C, alebo zmrazené pri teplote –20° (a nižšie).
- Označovanie vzoriek: vzorky musia byť jednoznačne označené v súlade so schválenými postupmi danej inštitúcie.

POSTUP

Poznámka: nastavenia sa môžu pre rôzne prístroje a softvéri líšiť. Vo všeobecnosti ale platí, že softvér daného readera je nastavený na zber dát v režime Vmean. Pri zadávaní testu do softvéra postupujte podľa návodu tak, aby vypočítaná hodnota bola priemernou hodnotou rýchlosti zmeny optickej hustoty všetkých nameraných bodov. Interval medzi načítaniami by mal byť 15 – 30 sekúnd. Nastavte vlnovú dĺžku v softvéri na 405 nm a 490 nm pre oďaťtanie pozadia. Ak nastavenie dvojitej vlnovej dĺžky nie je možné, načítajte iba pri 405 nm. Inkubačná teplota je 37 °C. Pred začatím čítania sa obsah doštičky musí pretrepať po dobu 5 – 10 sekúnd. Použite lineárnu kalibračnú krivku, alebo jej vhodný ekvivalent. Načítanie údajov by sa malo spustiť bez onesorenia.

- Príprava glukánového štandardu poskytnutého v súprave.
 - Rozpustite obsah jednej fľaštičky štandardu v RGW o objemu uvedenem na fľaštičke, tým pripravíte zásobný roztok s koncentráciou 100 pg/ml. Obsah vortexujete najmenej 30 sekúnd, aby sa úplne homogenizoval (roztok 1). Tento roztok sa musí skladovať pri teplote 2 – 8 °C a môže sa používať po dobu troch dní. Nižšie uvedené kroky „b“ až „e“ uvádzajú príklad prípravy kalibračnej krivky.
 - Prípravte štandard s koncentráciou 50 pg/ml zmiešaním 500 µl RGW a 500 µl roztoku 1 v skúmavke bez glukánu (roztok 2). Roztok najmenej 10 sekúnd vortexujte.
 - Prípravte štandard s koncentráciou 25 pg/ml zmiešaním 500 µl RGW a 500 µl roztoku 2 v skúmavke bez glukánu (roztok 3). Roztok najmenej 10 sekúnd vortexujte.
 - Prípravte štandard s koncentráciou 12,5 pg/ml zmiešaním 500 µl RGW a 500 µl roztoku 3 v skúmavke bez glukánu (roztok 4). Roztok najmenej 10 sekúnd vortexujte.
 - Prípravte štandard s koncentráciou 6,25 pg/ml zmiešaním 500 µl RGW a 500 µl roztoku 4 v skúmavke bez glukánu (roztok 5). Roztok najmenej 10 sekúnd vortexujte.
- Príprava reagencie na úpravu séra. Alkalická reagencia na úpravu séra mení conformáciu glukánu z triple-helix na single-strand (10,11), ktorá je reaktívnejšia. Vysoké pH taktiež deaktivuje serínové proteázy a inhibitory serínových proteáz v sére, ktoré by mohli viesť k falošným pozitívnym alebo negatívnym výsledkom (20).
 - Prípravte reagenciu na úpravu séra zmiešaním rovnakých objemov 0,25 M KOH a 1,2 M KCl a ich riadnym premiešaním. Odporúčané objemy sú max. 900 µl každej reagencie (umožňuje dve prípravy). Fľaštičky určené na použitie s druhou doštičkou zakryte Parafilmom. Použite tú stranu Parafilmu, ktorá smerovala k papierovej podložke.
 - Poznámka: pre grafické záznamenie kalibračnej krivky, vynásojte koncentráciu štandardov číslom päť, aby bol rozsah krivky od 500 do 31 pg/ml. Štandardy zadajte do softvéra v rovnakom formáte (500, 250, 125, 62,5 a 31 pg/ml).

Objem štandardu pri stanovení je 25 µl na jamku alebo päťnásobok objemu vzorky séra. Mikrotitračná doštičkou so štandardami (st), slepými vzorkami (blk) a 21 neznanými vzorkami (Uk) (každá z nich sa testuje duplicitne) je nastavená takto:

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

Poznámka 1: vonkajšie jamky možno použiť vtedy, ak sú kinetické charakteristiky vonkajších a vnútorných jamiek porovnateľné.
Poznámka 2: aby nedošlo k náhodnej kontaminácii, po pridaní vzoriek a reagencií do príslušných jamiek, prikryte doštičku krytom. Odstráňte kryt pred vložením platne do readeru, aby nedochádzalo k optickej interferencii v priebehu analýzy spôsobenej kondenzáciou.

- Pridanie séra a reagencie na úpravu séra.
 - Rozmrazte vzorky séra pri izbovej teplote. Všetky vzorky riadne premiešajte vortexovaním.
 - Prenešte 5 µl vzorky do každej príslušne označenej jamky (Uk) (najmenej duplicitne). Napipetujte každú vzorku séra.
 - Pridajte 20 µl reagencie na úpravu séra do každej jamky, ktorá obsahuje sérum. *Poznámka* : kroky „b“ a „e“ možno vykonať v obrátenom poradí podľa preferencie technika.
 - Pretrepte dosku 5 – 10 sekúnd, aby sa jej obsah riadne rozmiešal (možno použiť funkciu premiešavania dosky na readeri), a potom inkubujte v readeru po dobu 10 minút pri teplote 37 °C.
- Príprava reagencie Fungitell. Poznámka: prípravu možno jednoducho vykonať počas inkubácie pre úpravu séra.
 - Rekonšituujte jednu fľaštičku reagencie Fungitell pridaním 2,8 ml RGW a pridaním 2,8 ml Pyrosol pufru (použite mikropipetu na 1 000 µl). Fľaštičku zakryte Parafilmom (použite stranu Parafilmu, ktorá bola priložená k papierovej podložke). Opatrne fľaštičkou otáčajte, aby sa jej obsah rozpusťil (nepoužívajte vortex).
- Pridanie negatívnych kontrol a štandardov. Na konci inkubácie pred úpravu séra (krok 3.d) vyberte doštičku z readera, a pridajte do nej štandardy a negatívne kontroly.
 - Napipetujte 25 µl RGW do jamky G2 a G3.
 - Napipetujte 25 µl roztoku 5 s koncentráciou glukánu 6,25 pg/ml do jamky F2 a F3.
 - Napipetujte 25 µl roztoku 4 s koncentráciou glukánu 12,5 pg/ml do jamky E2 a E3.
 - Napipetujte 25 µl roztoku 3 s koncentráciou glukánu 25 pg/ml do jamky D2 a D3.
 - Napipetujte 25 µl roztoku 2 s koncentráciou glukánu 50 pg/ml do jamky C2 a C3.
 - Napipetujte 25 µl roztoku 1 s koncentráciou glukánu 100 pg/ml do jamky B2 a B3.
- Pridanie reagencie Fungitell a postup inkubácie doštičiek.
 - Pridajte 100 µl reagencie Fungitell do každej jamky (obsahujúcej negatívne kontrolné vzorky, štandardy a vzorky) opakovateľnou pipetou.
 - Vložte platňu do readera (vytemperovaného na 37 °C) s nasadeným krytom a pretrepte ju po dobu 5 – 10 sekúnd. Odstráňte kryt a načítavajte pri vlnovej dĺžke 405 nm a 490 nm po dobu 40 minút pri teplote 37 °C. Ak odpočítanie pozadia (pri vlnovej dĺžke 490 nm) nie je k možné, načítanie sa môže vykonať aj pri 405 nm. Ak fotometer nedisponuje funkciou pretrepania, môžete použiť externú trepačku na mikrotitračné dosky.
 - Výhodnotenie analýzy: vypočítajte priemernú rýchlosť zmeny absorbcie (v miliabsorbancných jednotkách za minútu) pre všetky namerané body v dobe od 0 do 40 minút.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Výsledky testu Fungitell by sa mali použiť ako pomôcka pri detekcii invazívnej hubovej infekcie. Výsledky sa vyzdujú v pg/ml séra v rozsahu kalibračnej krivky od nedetegovateľných hodnôt (< 31 pg/ml) až po > 500 pg/ml, a možno ich zo softvéra vytlačiť alebo oďaťat z kalibračnej krivky. Presné hodnoty nad 500 pg/ml vyžadujú, aby sa vzorka zriedila v RGW a jej testovanie sa zopakovalo.

Laboratórium vykonávajúce test by malo objednávaťjúceho lekára informovať o tom, že analýza Fungitell neslúži na detekciu niektorých typov húb, ako napríklad *Cryptococcus* (16,17), ktorý produkuje veľmi nízke úrovne látky (1→3)-β-D-glukán. Táto analýza neslúži ani na detekciu zygomycetov, napríklad *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus* (16,17), o ktorých nie je známe, že by produkovali látku (1→3)-β-D-glukán. Podobne aj *Blastomyces dermatitidis* v kvasinkovej fáze produkuje malé hodnoty (1→3)-β-D-glukánu a tento rod spravidla nemožno detegovať (18).

NEGATÍVNY VÝSLEDOK

Hodnoty (1→3)-β-D-glukánu < 60 pg/ml sa interpretujú ako negatívne výsledky.

POZITÍVNY VÝSLEDOK

Hodnoty > 80 pg/ml sa interpretujú ako pozitívne. Pozitívny výsledok znamená, že bol detegovaný (1→3)-β-D-glukán. Pozitívny výsledok však neznamená, že skutočne ide o hubovú infekciu. Diagnóza musí byť stanovená na základe ďalších klinických nálezov.

NEURČITÝ VÝSLEDOK

Hodnoty od 60 do 79 pg/ml naznačujú možnú hubovú infekciu. Odporúčame vykonať kontrolné vyšetrenie. Časť odber vzoriek a ich testovanie zvyšuje racionálne využitie testu pre primárnu diagnózu.

KONTROLA KVALITY

- Koeficient korelácie (r) lineárnej kalibračnej krivky by mal mať hodnotu > 0,980.
- Jamky (25 µl RGW) sú negatívne kontroly. Namerané hodnoty rýchlosti zmeny optickej hustoty (Vmean) negatívnych kontrol musia byť najmenej o 50% nižšie než namerané hodnoty najnižšieho Standardu. V opačnom prípade sa analýza musí zopakovať s použitím všetkých nových reagensí.
- Manipulácia s problémovými vzorkami. Ak analytik zistí výskyt zakalenej alebo pochybnej vzorky (napr. vzorky, ktoré sú príliš hemolyzované, lipemické alebo obsahujú nadbytok bilirubínu), táto vzorka sa musí zriediť v RGW a jej testovanie sa musí zopakovať. Riedenie musí byť zohľadnené pri vykazovaní výsledkov vo softvorení výsledku testu faktorom riedenia. Faktor riedenia sa spravidla zadáva do vnitřní a oprava sa aplikuje automaticky.
- Kontrolné vzorky (vzorky diskriminačných a vysokopozitívnych koncentrácií) sa môžu použiť na overenie spoľahlivosti testu a reagensí. Každý užívateľ tejto analýzy by si mal ustanoviť spôsob kontroly kvality a zabezpečiť tak svoju spôsobilosť vykonávať test.

OBMEDZENIA TESTU

- Umiestnenie tkanív s hubovou infekciou (10), zapuzdrenie a množstvo (1→3)-β-D-glukánu produkované niektorými hubami môže ovplyvňovať koncentráciu séra v analyte. Obmedzená schopnosť niektorých hubových infekcií produkovať (1→3)-β-D-glukán, ktorý sa podieľa na celkovej koncentrácii glukánu v krvnom obehu, môže obmedziť ich detekciu. *Cryptococcus* spp. produkuje nízke hladiny (1→3)-β-Dglukánu (11) v dôsledku zapuzdrenia bunky. Zygomycety vrátane *Absidia*, *Mucor* spp. a *Rhizopus* spp. (16,17) nevytvárajú (1→3)-β-D-glukán (16,17). Podobne aj Blastomyces dermatitidis v kvasinovej fáze produkuje nízke hodnoty (1→3)-β-D-glukánu a výsledky testu sú spravidla negatívne (18).
- Niektorí jednotlivci majú zvýšené hodnoty (1→3)-β-D-glukánu, ktoré spadajú do neurčite zóny. V takýchto prípadoch sa odporúča vykonať ďalšie testovanie.
- Frekvencia testovania pacientov závisí od relatívneho rizika hubovej infekcie. U rizikových pacientov sa odporúča odber vzoriek dva alebo trikrát týždenne.
- Pozitívne výsledky boli zistené u pacientov podstupujúcich hemodialýzu (12,13), pacientov liečených niektorými frakčnými krvnými produktmi, ako napríklad sérovým albumínom alebo imunoglobulínmi (19) a vo vzorkách pacientov, ktorí boli vystavení gáze s obsahom glukánu. Je dôležité správne zvoliť intervaly odberu krvi u po-operačných pacientov, aby sa zistila skutočná hladina (1→3)-β-D-glukánu a nie jej krátkodobý prudký nárast ako dôsledok používania tampónov a gázy, ktoré uvoľňujú glukán. Bazálna hladina (1→3)-β-D-glukánu je obnovená na 3. az 4. deň po operácii (6).
- Vzorky získané z päty alebo bruška prsta pomocou lancety nie sú vhodné, pretože použitie gázy namočenej v alkohole na prípravu miesta odberu vzorky (a zmiešanie krvi na pokožke), vedie ku kontaminácii vzoriek.
- Hladiny koncentrácií pre interpretáciu testu boli určené pre dospelého pacienta. Normálne hodnoty u detí a mladistvých dosahujú hodnoty dospelých pacientov (21). Údaje pre novorodencov a dočatá mladšie než šesť mesiacov nie sú k dispozícii.
- Vykázateľný rozsah analýzy je od 31 pg/ml do 500 pg/ml. Hodnoty nižšie než 31 pg/ml sa musia vykazovať ako < 31 pg/ml. Hodnoty > 500 pg/ml sa musia vykazovať ako hodnoty > 500 pg/ml.

RUIŠIVÉ LÁTKY

Správnosť výsledkov analýzy Fungitell môžu narušať:

- hemolýza,
- zakalenie vzorky spôsobené lipémiou,
- vizuálne zjavná prítomnosť bilirubínu,
- zakalené sérum.

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Hodnoty beta glukánu sú zvýšené v rámci rôznych hubových infekcií. Keď sú príznaky a symptómy prítomné pri úrovni 80 pg/ml alebo vyššej, predikatívna hodnota pozitívnosti pacienta na hubovú infekciu dosahuje 74,4 až 91,7 % (tabuľka 2). Za neprítomnosti príznakov a symptómov pri hodnote nižšej než 60 pg/ml je negatívna predikatívna hodnota od 65,1 % do 85,1 %.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Porovnávacie testovanie

Ukutočnila sa multicentrická perspektívna štúdia, ktorej cieľom bolo zhodnotiť charakteristiky účinnosti analýzy Fungitell. Tento test bol porovnaný s ďalšími štandardnými metódami detekcie mykóz a fungémií (napr. krvná kultúra, histopatologické vyšetrenie bioptických vzoriek a rádiologické príznaky).

V rámci analýzy bolo testovaných tristo päťdesiatdeväť (359) pacientov. Od každého pacienta bola odobraná jedna vzorka. Nízkorizikoví pacienti zahŕňali zjvne zdravých jedincov a jednotlivcov v klinických lokalitách, ktorí boli hospitalizovaní z iných dôvodov, než je hubová infekcia. Nábor pacientov prebiehal v šiestich klinických lokalitách v USA. Štyri klinické lokality vykonávali analýzu a testovali celkom 285 vzoriek. Spoločnosť ACC testovala všetkých 359 vzoriek dvakrát, ale na stanovenie účinnosti analýzy bol použitý iba druhý súbor výsledkov. Výsledky druhého súboru analýz neboli štatisticky odlišné od prvého súboru.

Citlivosť celej populácie pacientov (359) vrátane *Cryptococcus* bola 65,0 % (interval spoľahlivosti (C. I.) 60,1 – 70,0 %). Špecifickosť dosiahla hodnotu 81,1 % (C. I. 77,1 – 85,2 %) (tabuľka 1). Výsledky zo štyroch testovacích lokalít dosiahli rozsah citlivosti od 50,0 % do 66,7 %. Rozsah špecifickosti vzhľadom na 285 testovaných vzoriek bol od 70,0 % do 93,0 % (tabuľka 2).

Tabuľka 1	Výsledky testu ACC pri hraničnej hodnote 60 – 80 pg/ml podľa lokalít							
Lokalita	Overené/Pravdepodobné Citlivosť' >= 80 pg/ml		Špecifickosť' < 60 pg/ml			Neisté 60 <= X < 80	Celkom	
	Poz./Klin. poz.	Citlivosť'	Pozitívna predikatívna hodnota	Neg./Klin. neg.	Špecifickosť'			Negatívna predikatívna hodnota
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	Nedostupné	0/0	Nedostupné	0,0	0	1
Celkom*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

*Vrátane jednej vzorky z lokality 6.

Po porovnaní výsledkov získaných od ACC (359 vzoriek) a výsledkov z klinických lokalít (285 vzoriek) s klinickou diagnostikou je hodnota citlivosti 64,3 % (58,8 % – 69,9 % C. I.) pre ACC a 61,5 % (55,9 % – 67,2 % C. I.) pre lokality. Špecifickosť dosiahla hodnotu 86,6 % (82,7 % – 90,6 % C. I.) pre ACC a 79,6 % (74,9 % – 84,3 % C. I.) pre lokality (tabuľka 2).

Tabuľka 2	Výsledky testu testovacích lokalít pri hraničnej hodnote 60 – 80 pg/ml podľa lokalít							
Lokalita	Overené/Pravdepodobné Citlivosť' >= 80 pg/ml		Špecifickosť' < 60 pg/ml			Neisté 60 <= X < 80	Celkom	
	Poz./Klin. poz.	Citlivosť'	Pozitívna predikatívna hodnota	Neg./Klin. neg.	Špecifickosť'			Negatívna predikatívna hodnota
1	32/50	64,0	74,4	28/40	70,0	65,1	4	90
2	12/24	50,0	75,0	15/20	75,0	65,2	5	44
3 *								
4	22/33	66,7	91,7	40/43	93,0	85,1	5	76
5	22/36	61,1	78,6	30/39	76,9	75,0	7	75
6 *								
Lokality celkom	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 je testovacia lokalita**

KANDIDÓZA

Perspektívna štúdia zahŕňala 107 pacientov s pozitívnuo diagnózou kandidózy. 83 zo 107 pacientov bolo pozitívnych podľa analýzy Fungitell.

Stodvadsaťpäť vzoriek kandidózy bolo odoslaných do spoločnosti Associates of Cape Cod. 145 zo 175 pacientov bolo pozitívnych podľa analýzy Fungitell.

ASPERGILÓZA

10 pacientov bolo pozitívnych na aspergilózu. 8 z 10 pacientov bolo pozitívnych podľa analýzy Fungitell.

FUSARIÓZA

Traja pacienti boli pozitívni na fusariózu. 2 z 3 pacientov boli pozitívni podľa analýzy Fungitell.

ANTIFUNGÁLNA MEDIKAMENTÓZNA LIEČBA

Existencia alebo neexistencia antifungálnej medikamentózne liečby nemala štatisticky významný vplyv na citlivosť analýzy. 118 pacientov bolo pozitívnych na invazívnu hubovú infekciu a na antifungálnu liečbu. 82 pacientov bolo pozitívnych podľa tejto analýzy (citlivosť' 69,5 %; 61,2 % – 77,8 % C. I.). Okrem toho bolo dvadsaťštyri (24) pacientov pozitívnych, neboli však pozitívni na žiadnu antifungálnu liečbu. 18 pacientov bolo pozitívnych podľa tejto analýzy (citlivosť' 75 %; 57,7 % – 92,3 % C. I.).

ŠPECIFICKOSŤ

Celkom 170 pacientov bolo negatívnych na hubovú infekciu a išlo o zjavne zdravých jedincov. Špecifickosť podľa tejto analýzy dosiahla hodnotu 86,5 % (82,8 % – 90,1 % C. I.). Po zahrnutí ďalších 26 pacientov, ktorí boli negatívni na hubovú infekciu, ale trpeli inými ochoreniami, sa dosiahla špecifickosť' 81,1 % (77,1 – 85,2 % C. I.).

KORELÁCIE TESTU

Štyri klinické lokality vykonali analýzu 285 vzoriek. Výsledky lokalít kvantitatívne korelovali na úrovni 96,4 % s výsledkami spoločnosti Associates of Cape Cod. Korelácie spoločnosti Associates of Cape Cod s inými testovacími lokalitami dosahovali hodnoty od 90,6 do 99,2 %.

PRESNOSŤ

V rámci štúdií presnosti sa tromi rôznymi spôsobmi a v troch rôznych lokalitách uskutočnilo testovanie desiatich (10) rôznych vzoriek (každá lokalita testovala každú vzorku). Vnútrná analytická odchýlka dosiahla hodnotu od 0,9 do 28,9 %. Odchýlka medzi analýzami dosiahla hodnotu od 3,9 do 23,8 %. Štyri (4) negatívne vzorky boli vyraďené z obidvoch analýz.











- 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., Kantarijian, 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 antifumor 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.

ĎALŠIA NEUVÁDZANÁ REFERENČNÁ LITERATÚRA

- 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.

VYSVETLIVKY K SYMBOLOM

	„Spotrebujte do“
	„Obsah postačujúci na N testov“
	„Kód šarže“
	„Medicínske zariadenie na diagnostiku in vitro“
	„Katalógové číslo“
	„Teplotné obmedzenie“
	„Výrobca“
	„Prečítajte si návod na použitie“
	„Autorizovaný zástupca“
	„Značka CE“

	Associates of Cape Cod® International, Inc. Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Veľká Británia
---	--