

<p>Analýza látky (1→3)-β-D-Glukán v sére</p>	
<p>FUNGITELL®</p>	
<p>Návod na použitie</p>	
	<p>Telefón: +1 508 540 3444 Bezplatná telefónna linka: +1 888 395 2221 Fax: +1 508 540 8680 Technická podpora: +1 800 848 3248 Oddelenie služieb pre zákazníkov: +1 800 525 8378</p>
<p>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</p>	<p>42</p> 
<p>PNO01268-sk Rev. 1</p>	<p>Posledná revízia február 2011.</p>

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 (1)) sa môže použiť ako pomôcka pri diagnostike hĺboko uložených mykóz a fungémii (2). Pozitívny výsledok neuvádza, ktoré typy húb môžu spôsobovať infekciu.

Fungitell sa musí používať spolu s ďalšími diagnostickými postupmi, ako napríklad mikrobiologickou kultúrou, histologickým vyšetrením biotických vzoriek a rádiologickým vyšetrením.

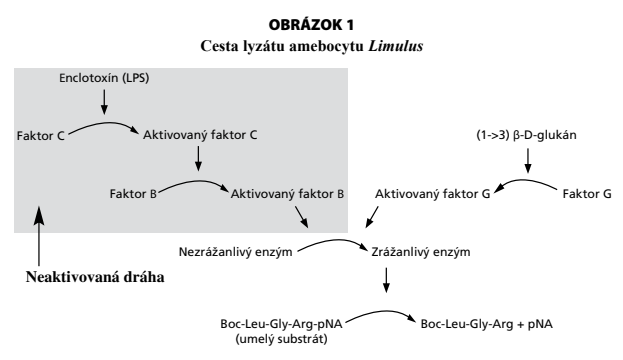
<p>Dôležité – odporúčame, aby ste odosielajúcemu lekárovi poskytli tieto informácie:</p>
<p>Analýza Fungitell neslúži na detekciu niektorých typov húb, ako napríklad patogénnej kvasinky <i>Cryptococcus</i>, ktorá produkuje veľmi nízke úrovne látky (1→3)-β-D-Glukán (3, 4). Táto analýza neslúži ani na detekciu zymogycetov, napríklad <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> a <i>Rhizopus</i> (1, 4), 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 (5).</p>
<p>Pri vykazovaní výsledkov testu analýzy glukánu zahrňte aj toto vyjadrenie.</p>

<p>SÚHRN A VYSVETLENIE</p>
<p>Výskyt hubových infekcií spôsobených oportunistickými patogénmi, najmä u pacientov s oslabenou imunitou, narastá (6, 7, 8). 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 (9, 10). Mnohé hubové choroby sa získajú vdychovaním hubových spór pochádzajúcich z pôdy, rastlinných nánosov, klimatizácie alebo z exponovaných povrchov. Niektoré oportunistické huby sú prítomné na alebo v pokožke človeka, črevnom trakte a v slizniciach (11, 12). Diagnostika invazívnych mykóz a fungémii je spravidla založená na nešpecifických diagnostických alebo rádiologických postupoch. V nedávnej minulosti boli biologické markery hubovej infekcie pridané k dostupným diagnostickým metódam (2).</p>

Oportunistickými hubovými patogénmi sú *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* a *Pneumocystis jirovecii*. Látka (1→3)-β-D-Glukán produkovaná týmito organizmami (a inými organizmami) sa dá detegovať pomocou analýzy Fungitell (1, 8, 13).

PRINCÍPY PROCEDÚRY
Analýza Fungitell meria hladiny (1→3)-β-D-Glukánu. Táto analýza je založená na modifikácii cesty lyzátnu amebocytu z *Limulus polyphemus* (LAL) (14, 15, 16, 17), 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 serínové 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 nárstu absorbcancie produkovanvej 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®, pufo pre rekonštitúciu Fungitell reagenencie, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (dve fľaštičky). Ďalšie fľaštičky pufru pre rekonštitúciu Pyrosol (katológové číslo BC051) možno zakúpiť osobitne.
- 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 reagenencie 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.

<p>UPOZORNENIA A PREVENTÍVNE OPATRENIA <i>Tento produkt je určený na DIAGNOSTICKÉ POUŽITIE IN VITRO.</i></p>
<p>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 reprodukateľnosť testu.</p>

- Niektoré druhy húb produkujú len veľmi nízke hladiny (1→3)-β-D-Glukánu a analýza Fungitell ich spravidla nedokáže detegovať. Ide o rod *Cryptococcus* (3, 4) a o zygomycety *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus* (1, 4). Okrem toho rod *Blastomyces dermatitidis* v kvasinkovej forme produkuje nízke hladiny (1→3)-β-D-Glukánu a preto ho analýza Fungitell spravidla nedokáže detegovať (5).
- Nepipetujte žiadny materiál ústami. V mieste manipulácie so vzorkami alebo reagenциami neľafajte, nejedzte ani nepite.
- Vytvorte si čisté prostredie, v ktorom sa bude analýza vykonávať. Používajte materiály a reagenencie, 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 reagenencie 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 vhodné ochranný odev a rukavice bez púdu.
- Sérum pacientov podstupujúcich hemodialýzu môže obsahovať vysoké úrovne (1→3)-β-D-Glukánu, ak sa na nich používali niektoré celulózové dialytické membrány (18, 19). 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-operačných pacientov (20, 21).
- 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. Pripravená reagenция Fungitell sa musí skladovať pri teplote 2 – 8 °C a musí sa použiť do 2 hodín. Pripravenú reagenцию Fungitell možno uchovávať aj zmrazenú pri –20 °C po dobu 20 dní a použiť iba raz rozmrazenú.

Manipulácia so vzorkami
1. Odber vzoriek: sérové vzorky sa musia odoberať do sterilných vákuových skúmaviiek (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-Glukánu.
2. Skladovanie vzoriek: sérové vzorky možno pred analýzou skladovať pri teplote 2 – 8 °C, alebo zmrazené pri teplote –20° (a nižšie). Testovanie by sa malo vykonať okamžite, aby nedošlo k degradácie vzorky.
3. 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. Nastavte interval medzi jednotlivými načítaniami na minimum povolené softvérom a nástrojom po dobu 40 minútového testu. Nastavte vlnovú dĺžku v softvéri na 405 nm a 490 nm pre odčítanie 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 oskenorenia.

- Príprava glukánového štandardu poskytnutého v súprave.
 - Rozpusťte obsah jednej fľaštičky štandardu v RGW o objemu uvedeném 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.
 - Pripravte 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.
 - Pripravte 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.
 - Pripravte 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.
 - Pripravte 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 reagenция na úpravu séra. Alkalická reagenция na úpravu séra mení konformáciu glukánu z triple-helix na single-strand (16, 17), ktorá je reaktívnejšia. Vysoké pH taktiež deaktivuje serinové proteázy a inhibitory serinových proteáz v sére, ktoré by mohli viesť k falošným pozitívnym alebo negatívnym výsledkom (22).
 - Pripravte reagenция 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 reagenция (umožňuje dve prípravy). Fľaštičky určené na použitie s druhou doštičkou zakryté Parafilmom. Použite tú stranu Parafilmu, ktorá smerovala k papierovej podložke.
- Poznámka: pre grafické záznamenie kalibračnej krivky, vynáobte 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 pätnásobok objemu vzorky séra. Mikrotitračná doštičkou so štandardami (st), slepými vzorkami (blk) a 21 neznámymi 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 reagenци 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 reagenция na úpravu séra.
 - Rozmrazte vzorky séra pri izbovej teplote. Všetky vzorky riadne premiešajte vortexovaním.
 - Preneste 5 µl vzorky do každej príslušne označenej jamky (Uk) (najmenej duplicitne). Napipetujte každú vzorku séra.
 - Pridajte 20 µl reagenция na úpravu séra do každej jamky, ktorá obsahuje sérum. *Poznámka:* kroky „b“ a „c“ možno vykonať v obrátenom poradí podľa preferencie technika.
 - Pretrepte dosku 5 – 10 sekúnd, aby sa jej obsah riadne rozmielal (možno použiť funkciu premiešavania dosky na readeri), a potom inkubujte v readeru po dobu 10 minút pri teplote 37 °C.
- Príprava reagenция Fungitell. Poznámka: prípravu možno jednoducho vykonať počas inkubácie pre úpravu séra.
 - Rekonštituujte jednu fľaštičku reagenция 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 rozptulil (nepoužívajte vortex).
- Pridanie negatívnych kontrol a štandardov. Na konci inkubácie pre 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 reagenция Fungitell a postup inkubácie doštičiek.
 - Pridajte 100 µl reagenция 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.
 - Vyhodnotenie analýzy: Zamerajte sa na graf optickej hustoty versus čas pre jednotlivé vzorky and skontrolujte či kinetickej krivky vzoriek zodpovedajú krivkám štandardov. Ak je nárast optickej hustoty iný ako plynulý, ide pravdepodobne o optickú interferenciu a také krivky sú vylúčené z analýzy. Vypočítajte priemernú rýchlosť zmeny absorbcancie (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 vyjadrujú v pg/ml séra v rozsahu kalibračnej krivky od nedetegovateľných hodnôt (< 31 pg/ml) až po > 500 pg/ml, a možno ich so softvéra vytlačiť alebo odčítať 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 objednávaťúceho lekára informovať o tom, že analýza Fungitell neslúži na detekciu niektorých typov húb, ako napríklad *Cryptococcus* (3, 4), ktorý produkuje veľmi nízke úrovne látky (1→3)-β-D-Glukán. Táto analýza neslúži ani na detekciu zygomycetov, napríklad *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus* (1, 4), 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 (5).

