

Analüüsimetod (1→3)-β-D-Glükaani määramiseks seerumist	
FUNGITELL®	
Kasutusjuhend	
	Telefon: +1 508 540-3444 Tasuta: +1 888 395-2221 Faks: +1 508 540-8680 Tehniline tugi: +1 800 848-3248 Klienditeenindus: +1 800 525-8378
 	 

PN001268-et Rev1

Läbi vaadatud veebruaris 2011.

OTSTARVE

Fungitelli analüüsimetod on proteaasi sümogeenil põhinev kolorimeetriline analüüs (1→3)-β-D-Glükaani kvalitatiivseks tuvastamiseks patsientide seerumist, kellel on invasiivse seeninfektsiooni sümptomid või selle eelsoodumust tekitavad seisundid. Mitmete meditsiiniliselt oluliste seente (1) rakuseina põhikomponendi, (1→3)-β-D-Glükaani seerumikontsentratsiooni võib kasutada abistava vahendina süvamükosiidide ja fungeemiate diagnoosimisel (2). Positiivne tulemus ei näita seda, milline seente klass võib infektsiooni põhjuseks olla.

Seda peab kasutama koos teiste diagnostiliste meetodite, näiteks mikrobioloogiliste külvide, bioplaatide histoloogiliste uuringute ja radioloogiliste uuringutega.

Tähtis! Analüüsi tellivale arstile soovitatakse edastada järgmine info.
<p>Fungitelli analüüsimetodiga ei saa tuvastada teatud seeneliike, näiteks nagu perekonna <i>Cryptococcus</i> liike, mis toodavad (1→3)-β-D-Glükaani (3,4) väga väikestes kogustes. Analüüsimetodiga ei saa tuvastada sügomütsete, näiteks perekondade <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> ja <i>Rhizopus</i> (1,4) liike, mis teadaolevalt ei tooda (1→3)-β-D-Glükaani. Ka <i>Blastomyces dermatitidis</i> toodab pärmsenee faasis (1→3)-β-D-Glükaani vähe, mistõttu ei pruugi see organism olla analüüsimetodiga tuvastatav (5).</p>
Lisage see teade väljastatavatele glükaani analüüsitulemustele.

KOKKUVÖTE JA SELGITUS

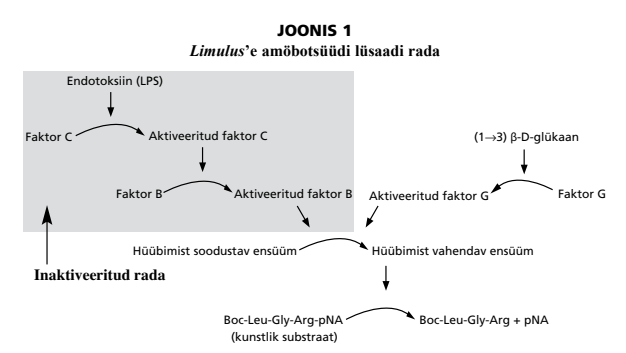
Oportunistlike patogeenide põhjustatud seeninfektsioonide esinemissagedus suureneb pidevalt, eriti immuunpuudulikkusega patsientidel (6,7,8). Invasiivsed seeninfektsioonid kui oportunistlikud infektsioonid on sagedad pahaloomuliste hematoloogiliste kasvajate ja AIDSiga patsientide puhul ning moodustavad üha suureneva osa hospitalaalfunktsioonidest, seda eriti elundi siirdamise läbi teinud patsientidel ja teistel immuunsuppressantravi saavatel patsientidel (9,10). Paljud seenhaigused saadakse maapinnast, taimede jääkidelt, õhukäitlussüsteemidelt ja/või eksponeeritud pindadelt pärinevate seeneoste sissehingamisel. Mõned oportunistlikud seened esinevad inimese nahal või nahas, seedetraktis ja limaskestadel (11,12). Invasiivsete mükosiidide ja fungeemiate diagnoos põhineb peamiselt mittespetsiifilistel või radioloogilistel meetoditel. Hiljuti on olemasolevatele diagnoosimeetoditele lisandunud ka seeninfektsiooni kindlaksmääramine biomarkerite abil (2).

Oportunistlike seenpatogeenide hulka kuuluvad *Candida* liigid, *Aspergillus* liigid, *Fusarium* liigid, *Trichosporon* liigid, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* liigid, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schencki* ja *Pneumocystis jirovecii*. Fungitelli analüüsimetodiga (1,8,13) on võimalik tuvastada neis ja teistes organismides toodetud (1→3)-β-D-Glükaani.

PROTSEDUURI PÕHIMÕTE

Fungitelli analüüsimetood mõõdab (1→3)-β-D-Glükaani taset seerumis. Meetod põhineb *Limulus*'e amöbotsüüdi lüsaadi (LAL) raja modifikatsioonil (14,15,16,17), joonis 1. Fungitelli reaktiiv on modifitseeritud eemaldama faktorit C ja seega reageerima faktor G vahendatud kõrvalraja kaudu vaid (1→3)-β-D-Glükaaniga.

(1→3)-β-D-Glükaan aktiveerib faktori G, mis on seriinproteaasi sümogeen. Aktiveeritud faktor G muundab inaktiivse hüübimist soodustava ensüümi aktiivseks hüübimist vahendavaks ensüümiks, mis omakorda eraldab kromogeense peptiidsubtraadi Boc-Leu-Gly-Arg-pNA küljest pNA fragmendi, luues kromofoori, milles neeldub valgus lainepikkusega 405 nm. Allpool kirjeldatud Fungitelli kineetiline analüüsimetood põhineb proovis tekitatud optilise tiheduse suurenemise kiiruse määramisel. Kiirust tõlgendatakse vastavalt standardkõverale, mille tulemusena saadakse hinnanguline (1→3)-β-D-Glükaani kontsentratsiooniproovis.



FUNGITELLI KOMPLEKTIGA KAASAS OLEVAD MATERJALID

Fungitelli komplekt on mõeldud in vitro diagnostiliseks kasutamiseks. Ühes komplektis oleivad järgmisi materjale jätkub 110 lohu analüüsimiseks kahel mikroüiterplaadil (55 lohku kummalgi plaadil).

- Fungitell® reaktiiv, lüofiliseeritud (1→3)-β-D-Glükaani suhtes spetsiifiline LAL (kaks vialali).
- Pyrosol® rekonstitueerimispuhver, Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4 (kaks vialali). Pyrosol rekonstitueerimispuhvri lisaviaale (katalooginumbriga BC051) on võimalik eraldi juurde osta.
- Glükaani standard, lüofiliseeritud Pachyman ja inertne täitja etiketile märgitud (1→3)-β-D-Glükaani sisaldusega (kaks vialali).
- Reaktiivi kvaliteediga vesi (kaks pudelit).
- Püroplaadid: sileda pinnaga 96 augega katmata ja kaanega mikroplaadid, mis ei sisalda häirivaid glükaane (kaks).
- KCl 1,2 M (üks vial).
- KOH 0,25 M (üks viaal).

Mitte ükski ülalloetletud materjal, välja arvatud standard, ei sisalda häirivas hulgas (1→3)-β-D-Glükaani.

VAJALIKUD MATERJALID, MIDA KOMPLEKTIS EI OLE

Kõik materjalid peavad olema vabad häirivatest glükaanidest. Klaasnõud peavad kasutamiskõlblikuks muutmiseks olema kuivkuumusega depürogeenitud vähemalt temperatuuril 235 °C 7 h jooksul (või töödeldud muu valideeritud ekvivalentse meetodiga).

- Pipetiotsikud* (250 µl - kataloogi nr PPT25, 1000 µl - kataloogi nr PPT10).
- Pipetit, millega saab mõõta 5...25 µl ja 100...1000 µl mahte.
- Reguleeritav automaapipett koos süstlaotsikutega, millega saab mõõta 100 µl mahtu.
- Katsutiid® standardseeria valmistamiseks ja seerumi töötluse reaktiividega segamiseks (13 x 100 mm borosilikaatklaas, kataloogi nr TB013).
- Sobiva arvutipõhise kineetilise analüüsi tarkvaraga ühendatud inkubatsiooni (37 °C) plaatlugeja, mis suudab jälgida kahte, 405 ja 409 nm, lainepikkust, ning mille dünaamiline vahemik on vähemalt kuni 2,0 neeldumisühikut.
- Steriilsed glükaanivabad keeratava korgiga säilituskatsutiid proovide jagamiseks (enamik katsutiide, mis sertifikaadi kohaselt on RNAaasi-, DNAaasi- ja pürogeenivabad ei sisalda häirivates kogustes ka (1→3)-β-D-Glükaani).
- Parafilm®

* Need ettevõtte Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) tarnitud tooted ei sisalda sertifikaadi kohaselt häirivas koguses glükaane.

Ettevaatus! Puuvillatroppeidga klaaspipetit on potentsiaalne glükaanidega saastumise allikas.

HOIATUSED JA ETTEVAATUSABINÕUD

Toode on mõeldud IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS.

<p>Fungitelli analüüsimetodi kasutamine eeldab tehnika ja testimiskeskonna hoolikat jälgimist. Analüüsi tegeva tehnika põhjalik väljaõpe ja saastumise vältimine on analüüsimetodi tõhusaks kasutamiseks kriitilise tähtsusega.</p>

- Teatud seeneliigid toodavad (1→3)-β-D-Glükaani väga vähe ning ei ole Fungitelli analüüsimetodiga enamasti tuvastatavad. Nende hulka kuuluvad perekond *Cryptococcus* (3,4), kuid ka sügomütseedid, näiteks *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus* (1,4). Lisaks toodab ka *Blastomyces dermatitidis* pärmsenee faasis (1→3)-β-D-Glükaani vähe ning ei ole seotüütü tavaliselt Fungitelli analüüsimetodiga tuvastatav (5).
- Ärge pipeteerige ühtegi materjali suuga. Ärge suitsetage, sööge ega jooge proovide või komplekti reaktiivide käitlemise piirkondades.
- Looge analüüsi läbiviimiseks puhas keskkond. Kasutage materjale ja reaktiive, mis sertifikaadi kohaselt ei sisalda häirivas hulgas (1→3)-β-D-Glükaani. Pange tähele, et Fungitelli analüüsi tegemist võivad häirida nii glükaanid kui ka inimkehalt, riietelt, konteineritest, veest ja õhutolmust lähtuv saastumine seentega.
- Ärge kasutage reaktiive pärast aegumiskuupäeva möödumist.

- Kahtlase värvusega või hägusad, näiteks olulise hemolüüsiga, lipeemilised või liigselt bilirubiini sisaldavad proovid võivad analüüsi tegemist häirida. Analüüsi tegemisel peab testitulemusi kontrollima optiliste segajate viidete ja/või ebatavaliste kineetiliste mustrite suhtes.

- Patsiendi proovide käitlemisel kasutage sobivat kaitseriietust ja talgivabu kindaid.
- Hemodialüüsi saavate patsientide seerum võib teatud dialüüsi tselluloosmembraanide kasutamisel sisaldada suures koguses (1→3)-β-D-Glükaani (18,19). Tselluloostriatsetat- või polümetüülmetakrülaatmembraanide kasutamine hemodialüüsil näib analüüsi tegemist mittemõjutavat.
- Kirurgilistest tampoonidest ja käsnadest võib vabaneda suures koguses (1→3)-β-D-Glükaani, mis võib olla üheks põhjuseks Fungitelli analüüsi saastusel põhinevate ajutiste positiivsete tulemuste saamisel operatsioonijärgsetel patsientidel (20,21).
- Kahjustatud sisuga komplekte ei tohi kasutada.
- Potentsiaalselt saastunud (patogeeni sisaldavate) vedelikke kokku puutunud materjalid peab hävitama vastavalt kohalikele regulatsioonidele.

Reaktiivide säilitamine

Hoidke kõiki reaktiive tarnitud kujul temperatuuril 2...8 °C pimedas. Rekonstitueeritud Fungitelli reaktiivi tuleb hoida temperatuuril 2...8 °C ja kasutada 2 tunni jooksul. Rekonstitueeritud Fungitelli reaktiivi võib kuni 20 päeva hoida külmutatuna temperatuuril -20 °C. Seda võib sulatada ja kasutada vaid ühel korral.

Proovide käitlemine

- Proovide kogumine. Seerumi proovid tuleb võtta steriilsetesse vaakumkatsutitesse (punase korgiga) või seerumi eraldamise katsutitesse ning lasta hüübida. Seejärel eraldatakse seerum hüübest ja viiakse sobivasse konteinerisse, mis ei sisalda häirivas hulgas (1→3)-β-D-Glükaani.
- Proovide säilitamine. Seerumi proove võib enne analüüsi tegemist hoida temperatuuril 2...8 °C või külmutatuna temperatuuril -20 °C või külmemas. Katsed tuleb läbi viia viivitamatult, et vältida võimalikku proovide lagunemist.
- Proovide märgistamine. Proovid peavad olema selgelt märgistatud vastavalt asutuses heaks kiidetud tavadele.

PROTSEDUUR

Märkus. Seadistused võivad erinevatel seadmetel ja tarkvaral olla erinevad. Üldiselt kehtivad järgmised reeglid. Seadistage plaatlugeja tarkvara andmeid koguma Vmean režiimis. Kontrollige tarkvara juhendist õigeid sätteid, et tagada väärtuse arvutamine optilise tiheduse muutuse keskmise kiirusega kõigi kogutud andmepunktiide jaoks. Optilist tihedust loetakse 40-minutilise ajavahemiku jooksul. Selle aja jooksul peab iga lugemitevaheline aeg olema seadistatud miinimumile, mida tarkvara ja mõõdik lubavad. Tarkvara lainepikkuse sätted peavad olema 405 nm miinus taust lainepikkusel 490 nm. Kui kahe lainepikkuse kasutamine ei ole võimalik, tehke mõõtmised lainepikkusel 405 nm. Inkubatsioonitemperatuur peab olema seadistatud temperatuuril 37 °C. Enne mõõtmiste alustamist peab toimuma plaadi raputamine 5...10 sekundit jooksul. Kõvera kuju seadistus peab olema lineaarne/lineaarne või sellele vastav. Mõõtmised peavad algama viivitusajata.

- Komplektis oleva glükaani standardi valmistamine.
 - Lahustage üks viaal glükaani standardi vialil näidatud koguse reaktiivi kvaliteediga veeaga, et saada lahus kontsentratsiooniga 100 pg/ml. Resuspendeerimiseks segage lahus (lahus 1) vähemalt 30 sekundit vortex-segistil. Glükaani lahust tuleb hoida temperatuuril 2...8 °C ja kasutada kolme ööpäeva jooksul. Alljärgnevad etapid b...e illustreerivad standardkõvera loomist.
 - Valmistage standard kontsentratsiooniga 50 pg/ml (lahus 2), segades glükaanivabas katsutis 500 µl reaktiivi kvaliteediga vett ja 500 µl lahust 1. Segage vortex-segistil vähemalt 10 sekundit.
 - Valmistage standard kontsentratsiooniga 25 pg/ml (lahus 3), segades glükaanivabas katsutis 500 µl reaktiivi kvaliteediga vett ja 500 µl lahust 2. Segage vortex-segistil vähemalt 10 sekundit.
 - Valmistage standard kontsentratsiooniga 12,5 pg/ml (lahus 4), segades glükaanivabas katsutis 500 µl reaktiivi kvaliteediga vett ja 500 µl lahust 3. Segage vortex-segistil vähemalt 10 sekundit.
 - Valmistage standard kontsentratsiooniga 6,25 pg/ml (lahus 5), segades glükaanivabas katsutis 500 µl reaktiivi kvaliteediga vett ja 500 µl lahust 4. Segage vortex-segistil vähemalt 10 sekundit.
- Seerumi eeltõtlusreaktiivi valmistamine. Aluseline seerumi eeltõtlusreaktiiv muudab kolmkheeliksigla glükaanid üheahelalisteks glükaanideks (16,17), mis on analüüsi tegemiseks reaktiivsemad. Kõrge pH inaktiveerib ka seerumi seriinproteaasid ja seriinproteaasi inhibiitorid, mis võivad põhjustada vastavalt valopositiivsete või valenegatiivsete tulemuste saamise (22).
 - Valmistage seerumi eeltõtlusreaktiiv, lisades võrdses koguses 0,25 M KOH ja 1,2 M KCl lahust ning segades korralikult vortex-segistil. Mõlema reaktiivi soovitatv kogus on kuni 900 µl, millest saab teha kaks analüüsi. Teisel plaadil kasutamiseks katke vialiid Parafilmiga. Katke viaal Parafilmi selle poolega, mis oli vastu paberkatet.

- Märkus. Standardkõvera koostamisel korratage standardite kontsentratsioonid väiega, et vahemik oleks 500...31 pg/ml. Sisestage standardid tarkvarasättesse vastavalt kui 500, 250, 125, 62,5 ja 31 pg/ml.

Standardi hulk analüüsis on 25 µl lohu kohta või viis korda rohkem kui seerumi proovi kogus. Mikroüiterplaat standardite (St), negatiivsete kontrollidega (Neg) ja 21 teadmata proovidega (T), millest igat ühte analüüsitakse kaks korda seatakse üles järgmise skeemi alusel:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		St1	St1		T1	T4	T7	T10	T13	T16	T19	
C		St2	St2		T1	T4	T7	T10	T13	T16	T19	
D		St3	St3		T2	T5	T8	T11	T14	T17	T20	
E		St4	St4		T2	T5	T8	T11	T14	T17	T20	
F		St5	St5		T3	T6	T9	T12	T15	T18	T21	
G		Neg	Neg		T3	T6	T9	T12	T15	T18	T21	
H												

- Märkus 1. Välimisi lohke võib kasutada, kui on näidatud, et välimistes lohudes saadud tulemused on võrreldavad sisemiste lohkude tulemustega. Märkus 2. Juhusliku saastumise vältimiseks pange mikroplaadi kaas tagasi pärast proovide ja reaktiivide lohkudesse lisamist. Eemaldage kaas enne plaadi lugejasse panemist kondenseerumisest tingitud optiliste häirete vältimiseks.

- Seerumi ja eeltõtlusreaktiivi lisamine.
 - Rekonstitueerime külmutatud proovid toatemperatuuril. Segage proovid vortex-segistil korralikult.
 - Viige 5 µl seerumi proovi vähemalt kahte vastavas auku (T). Korrake seda tegevust iga seerumi proovi jaoks.
 - Lisage 20 µl seerumi eeltõtlusreaktiivi igasse seerumit sisaldavasse lohu. Märkus. Etapid b ja c võib läbi viia vastupidises järjekorras vastavalt tehniku eelistustele.
 - Loksutage plaati 5...10 sekundit lohkude sisu segamiseks (kasutada võib lugeja plaadi loksutamise funktsiooni) ja seejärel inkubeerige 10 minutit inkubeerivas plaadilugejas temperatuuril 37 °C.
- Fungitelli reaktiivi rekonstitueerimine. Märkus. Seda on mugav teha eeltõtlusinkubatsiooni toimumise ajal.
 - Rekonstitueerige üks viaal Fungitelli reaktiivi, lisades 1000 µl pipetiga 2,8 ml reaktiivi kvaliteediga vett ja seejärel lisades 2,8 ml pürosooli rekonstitutsioonipuhvrit. Katke viaal Parafilmi Parafilmi selle poolega, mis oli paberlause poole suunatud. Keerutage viaalil õrnalt täieliku lahustumise saamiseks. Ärge kasutage vortex-segistit.
 - Negatiivsete kontrollide ja glükaani standardite lisamine. Seerumi eeltõtlusinkubatsiooni (etapp 3.d) lõpus võtke plaat inkubeerivast plaadilugejast välja ja lisage plaadile standardid ja negatiivsed kontrollid.
 - Lisage 25 µl reaktiivi kvaliteediga vett lohkudesse G2 ja G3.
 - Lisage 25 µl 6,45 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahust 5 lohkudesse F2 ja F3.
 - Lisage 25 µl 12,5 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahust 4 lohkudesse E2 ja E3.
 - Lisage 25 µl 25 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahust 3 lohkudesse D2 ja D3.
 - Lisage 25 µl 50 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahust 2 lohkudesse C2 ja C3.
 - Lisage 25 µl 100 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahust 1 lohkudesse B2 ja B3.
 - Fungitelli reaktiivi lisamine ja plaadi inkubeerimise protseduur.
 - Lisage reguleeritava automaapipetiga kõigisse (negatiivseid kontrolle, standardeid ja proove sisaldavatesse) aukudesse 100 µl Fungitelli reaktiivi.
 - Pange kaanega plaat mikroplaadi lugejasse (mis on ekvilibreeritud temperatuurile 37 °C) ja loksutage 5...10 sekundit. Tehke plaadi mõõtmised ilma kaaneta lainepikkusel 405 nm miinus 490 nm 40 minuti jooksul temperatuuril 37 °C. Kui tausta subtraktsioon (lainepikkusel 490 nm) ei ole võimalik, on aktspteeritav ka mõõtmiste tegemine ainult lainepikkusel 405 nm. Kui kasutada ei ole võimalik mikroplaadi lugeja plaadi loksutamise funktsiooni, võib kasutada välist mikroplaadi loksutajat.
 - Koguge andmed ja analüüsige järgmise skeemi alusel. Uurige testproovide optilise tiheduse jooniseid ja otsige kineetilisi mustreid, mis on väljaspool standardset sujuvat tõusu. Jooniseid, mis näitavad optilist interferentsi, ei tohi kasutada. Arvutage optilise tiheduse muutumise keskmine kiirus (milli-neeldumisühikut minutis) kõikide ajapunktide jaoks vahemikus 0 kuni 40 minutit.

TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Fungitelli testitulemusi võib kasutada abistava vahendina invasiivse seeninfektsiooni diagnoosimisel. Testitulemusi väljendatakse seerumi kontsentratsioonina pikogrammides milliliitris ja vahemikus alates mittemääratavast (<31 pg/ml) kuni väärtuseni >500 pg/ml ning need prinditakse välja tarkvara abil või loetakse standardkõveralt. Täpsete tulemuste saamiseks kontsentratsioonil üle 500 pg/ml on vajalik proovi lahjendamine reaktiivi kvaliteediga veega ja uus analüüsimine.

Analüüsi tegev labor peab teavitama analüüsi tellivat arsti, et Fungitelli analüüsimetood ei tuvasta teatud seeneliike, näiteks nagu perekonna *Cryptococcus* (3,4) liike, mis toodavad (1→3)-β-D-Glükaani väga väikestes kogustes. Analüüsimetoodiga ei saa tuvastada ka *sügomütseete*, näiteks perekondade *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus* (1,4) liike, mis teadaolevalt ei tooda (1→3)-β-D-Glükaani. Sarnaselt toodab ka *Blastomyces dermatitidis* pärmsene faasis (1→3)-β-D-Glükaani vähe ning ei ole seetõttu tavaliselt selle analüüsiiga tuvastatav (5).

NEGATIIVNE TULEMUS

(1→3)-β-D-Glükaani kontsentratsiooni <60 pg/ml tõlgendatakse negatiivse tulemusena.

POSITIIVNE TULEMUS

Väärtuseid ≥80 pg/ml tõlgendatakse positiivsena. Positiivne tulemus tähendab, et proovis tuvastati (1→3)-β-D-Glükaan. Positiivne tulemus ei defineeri haiguse olemasolu ning seda tuleb diagnoosimisel kasutada koos teiste kliiniliste nähtudega.

VAHEPEALNE TULEMUS

Väärtused vahemikus 60...79 pg/ml viitavad seeninfektsiooni võimalikkusele. Soovitav on korduv seerumi proovide võtmine ja analüüsimine. Proovide sage võtmine ja analüüsimine parandab diagnoosi õigsust.

KVALITEEDIKONTROLL

- Standardkõvera (lineaarne vs lineaarne) korrelatsioonikoeffitsent (r) peab olema >0,980.
- Esemeklaasi lohukesed, mis sisaldavad 25µl reaktiivi kvaliteediga vett, on negatiivsed kontrollid. Negatiivsete kontrollide tegeliku optilise tiheduse muutumise kiiruse (V_{mean}) väärtused peavad olema väiksemad kui 50% kõige väiksema kontsentratsiooniga standardi väärtustest. Vajadusel tuleb analüüst korrata kõigi uute reaktiividega.
- Probleemsete proovide käitlemine. Kui laborant avastab sogase, kahtlase värvusega või hägusas (nt olulise hemolütüüsiga, lipeemielsis või liigselt bilirubiini sisaldavas) testproovis optilise tiheduse ebatavalisi kineetilisi näidustusi, tuleb proovi lahjendada reaktiivi kvaliteediga veega ja uuesti analüüsida. Lahjendust peab tulemuste esitamisel arvestama ning tulemused tuleb korrutada lahjendusteguriga. Tavaliselt sisestatakse lahjendustegur proovi tarkvaraseadistusesse ja korrektsioon toimub automaatselt.
- Reaktiivide ja analüüsimetoodi õige toimimise kontrollimiseks võib analüüsi data kontrollproove piirväärtustel ja väga tugevalt positiivsetel väärtustel. Kõik testi kasutajad peavad rakendama kvaliteedikontrolli programmi, et tagada testi tegemise vilumus ja testi toimivus.

TESTI PIIRANGUD

- Selle analüüdi seerumikontsentratsiooni võivad mõjutada seeninfektsiooni asukoht kudedes (10), kapseldumine ja teatud seente toodetav (1→3)-β-D-Glükaani kogus. (1→3)-β-D-Glükaani vähenenud sisenemine vereringesse võib mõjutada võimet tuvastada teatud seeninfektsioone. *Cryptococcus* liigid toodavad (1→3)-β-D-Glükaani väikeses koguses raku kapseldumise tõttu (3,4). Sügomütseesid, sealhulgas *Absidia spp.*, *Mucori liigid* ja *Rhizopusi liigid* (1→3)-β-D-Glükaani teadaolevalt ei tooda (1,4). *Blastomyces dermatitidis* toodab pärmsene faasis (1→3)-β-D-Glükaani vähe ning testitulemused on seetõttu tavaliselt negatiivsed (5).
- Mõnedel inimestel esinevad kõrgenenud (1→3)-β-D-Glükaani tasemed vahepealsete väärtuste tsoonii jäävates kontsentratsioonides. Sellistel juhtudel on soovitatav lisauuringud.
- Patsiendi uurimise sagedus sõltub seeninfektsiooni esinemise suhtelisest riskist. Riskirühma patsientidel soovitatakse analüüsi teha vähemalt kaks kuni kolm korda nädalas.
- Positiivseid tulemusi on saadud hemodialüüsi patsientidel (18,19), teatud fraktsioneeritud veretoodetega, näiteks seerumi albumiini ja immuunglobuliinidega (23) ravitud patsientidel ja glükaani sisaldavate tamponiidega kokku puutunud uuritavate proovidest. Kirurgilisel kokkupuutel (1→3)-β-D-Glükaani sisaldavate käsnade ja tamponiidega on vajalik 3...4 päeva möödumine seerumi (1→3)-β-D-Glükaani kontsentratsiooni langemiseks baasväärtusele (20,21). Seetõttu tuleb kirurgiliste patsientide proovide võtmisel seda asjaolu arvesse võtta.
- Kanna või sõrme kapillaarvere punktsiooni saadud proovide kasutamine ei ole sobilik, sest näidatud on proovide saastumine uuringukoha ettevalmistamiseks kasutatava alkoholis niisutatud tamponiiga (ja potentsiaalselt ka vere kogunemisega nahapinnale).
- Testitulemused on määratud täiskasvanud patsientidel. Imikute ja laste normaalsed tasemed on ligilähedased täiskasvanud patsientide väärtustele (24). Andmed vastsündinuite ja nooremate kui kuuekuuste imikute kohta on siiski puudulikud.
- Analüüsi tulemuste vahemik on 31 pg/ml kuni 500 pg/ml. Väärtused alla 31 pg/ml esitatakse kujul <31 pg/ml, väärtused üle 500 pg/ml esitatakse kujul >500 pg/ml, välja arvatud juhul, kui proov on lahjendatud.

HÄIRIVAD AINED

Fungitelli õigete tulemuste saamist võivad häirida järgmised prooviga seotud seisundid:

- hemolüüs,
- lipeemiast tingitud proovi hägusus,
- silмага nähtava bilirubiinikoguse esinemine ja
- hägune seerum.

OODATAVAD VÄÄRTUSED

Beetaglükaani väärtused on tõusnud mitmete seeninfektsioonide korral. Kui 80 pg/ml või kõrgema väärtuse korral esinevad infektsiooni tunnused ja sümptomid, on seeninfektsiooni olemasolu ennustav väärtus uuritaval vahemikus 74,4...91,7% (tabel 2). 60 pg/ml ja väiksema väärtuse ning tunnuste ja sümptomite puudumise korral on analüüsi negatiivne ennustav väärtus vahemikus 65,1...85,1%.

ANALÜÜSI OMADUSED

Võrdlustestimine

Fungitelli analüüsimetodi omaduste valideerimiseks viidi läbi mitmekesuseline prospektiivne uuring (25). Analüüsimetoodit võrreldi mukooside ja fungeemiate tuvastamise teiste standardsete meetoditega (nt verekülv, bioptaatide histoloogiline uurimine ja radioloogilised tunnused).

Analüüsimetodiga uuriti 359 uuritavat. Kõigilt uuritavatelt võeti üks proov. Madala riskiga uuritavate hulka kuulusid ka ilmselt terved inimesed ning patsiendid, kelle hospitaliseerimise põhjuseks olid muud haigused kui seeninfektsioonid. Uuritavaid värvati Ameerika Ühendriikides kuues kliinilises keskuses. Neljas kliinilises keskuses analüüsti ja uuriti kokku 285 proovi. ACC analüüsis kõiki 359 proovi kaks korda, kuid kasutas analüüsi toimivuse määramiseks vaid teise analüüsi tulemusi. Teise analüüsi tulemused ei olnud esimestest tulemustest statistiliselt oluliselt erinevad.

Tundlikkusk kogu uuritavate populatsioonis (359), sealhulgas *Cryptococcus*^s e korral, oli 65,0% (usaldusvahemik 60,1...70,0%). Spetsiifilisus oli 81,1% (usaldusvahemik 77,1...85,2%) (tabel 1). Nelja uuringukoha tulemuste tundlikkuse vahemik oli 50,0...66,7%. 285 analüüsitud proovi spetsiifilisus oli vahemikus 70,0...93,0% (tabel 2).

Tabel 1.	ACC analüüsitulemused vahemiku 60...80 pg/ml piirväärtustel uuringukohtade kaupa.								
Uuringukoht	Tõestatud / tõenäoline Tundlikkus ≥80 pg/ml		Spetsiifilisus <60 pg/ml				Ebaseelge 60 ≤ X < 80	Kokku	
	Positiivne / kliiniliselt positiivne	Tundlikkus	Positiivne emnustav väärtus	Negatiivne / kliiniliselt negatiivne	Spetsiifilisus	Negatiivne emnustav väärtus			
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	Ei kohaldu	0/0	Ei kohaldu	0,0	0	1	
Kokku*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359	

*** Sisaldab ühte proovi uuringukohast nr 6.**

Kui ACC (359 proovi) ja kliiniliste keskuste (285 proovi) tulemusi võrreldi kliinilise diagnoosiga, siis oli tundlikkusk ACC jaoks 64,3% (usaldusvahemik 58,8...69,9%) ja uuringukohtade jaoks 61,5% (usaldusvahemik 55,0...67,2%). Spetsiifilisus oli ACC jaoks 86,6% (usaldusvahemik 82,7...90,6%) ja uuringukohtade jaoks 79,6% (usaldusvahemik 74,9...84,3%) (tabel 2).

Tabel 2.	Uurimiskohtade analüüsitulemused vahemiku 60...80 pg/ml piirväärtustel uuringukohtade kaupa.								
Uuringukoht	Tõestatud / tõenäoline Tundlikkus ≥80 pg/ml		Spetsiifilisus <60 pg/ml				Ebaseelge 60 ≤ X < 80	Kokku	
	Positiivne / kliiniliselt positiivne	Tundlikkus	Positiivne emnustav väärtus	Negatiivne / kliiniliselt negatiivne	Spetsiifilisus	Negatiivne emnustav väärtus			
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 *									
Kokku, uuringukohad	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	

*** Ei ole uuringukoht**

KANDIDOOS

Prospektiivses uuringus osales 107 kinnitatud kandidoosi diagnoosiga patsienti. Fungitelli analüüsiiga saadi positiivne tulemus 83 uuritaval 107st.

Ettevõttele Associates of Cape Cod saadeti 175 kandidoosi teegiproovi. Analüüsiiga saadi positiivne tulemus 145 proovis 175st.

ASPERGILLOOS

Aspergilloosi diagnoos oli kokku 10 uuritaval. Analüüsiiga saadi positiivne tulemus 8 proovis 10st.

FUSARIOOS

Kolmel uuritaval oli fusarioosi diagnoos. Analüüsiiga saadi positiivne tulemus 2 proovis 3st.

SEENEVASTANE RAVI

Seenevastase ravi kasutamine või mittekasutamine analüüsi tundlikkust statistiliselt olulisel määral ei mõjutanud. 118 uuritaval oli tõestatud invasiivse seeninfektsiooni diagnoos ja nad said seenevastast ravi. Analüüsiiga saadi positiivne tulemus 82 uuritaval (tundlikkus 69,5%, usaldusvahemik 61,2...77,8%). Lisaks sellele esines invasiivse seeninfektsioon 24 uuritaval, kes seenevastast ravi ei saanud. Analüüsiiga saadi positiivne tulemus 18 uuritaval (tundlikkusk 75%, usaldusvahemik 57,7...92,3%).

SPETSIIFILISUS

Seeninfektsiooni ei esinenud kokku 170 uuritaval, kes olid ka nähtavalt terved isikud. Analüüsimetodi spetsiifilisus oli 86,5% (usaldusvahemik 82,8...90,1%). Kui lisati veel 26 uuritavat, kellel seeninfektsiooni ei esinenud, kui esinesid muud haigused, saadi spetsiifilisus 81,1% (usaldusvahemik 77,1...85,2%).

ANALÜÜSITULEMUSTE KORRELEERUMINE

Neljas kliinilises keskuses analüüsti ja uuriti kokku 285 proovi. Uuringukohtade analüüsitulemused korreleerisid kvantitatiivselt 96,4% ulatuses ettevõtte Associates of Cape Cod tulemustega. Ettevõtte Associates of Cape Cod tulemused korreleerusid erinevate uuringukohtade tulemustega 90,6...99,2% ulatuses.

TÄPSUS

Täpsuse uuringutes analüüüsti kümnet (10) erinevat proovi kolmes uuringukeskuses kolmel erineval päeval. Analüüsisisene variatsioon oli vahemikus 0,9...28,9%. Analüüsidevahelised väärtused varieerusid vahemikus 3,9...23,8%. Neli (4) negatiivset proovi jäeti mõlemast analüüsist välja.

VITIED

- Odobasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-gluacan levels of culture supernatants of a variety of fungi. Medical Mycology 44: 267-272.
- De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin. Inf Dis. 46: 1813-1821.
- Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K-I., Ishikawa, N., and Hara, K. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Gluacan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. J. Clinical Microbiol. 33: 3115-3118.
- Mitsuya, M., Wada, K. and Yamaguchi, H. 1994. In vitro studies on the release of G Test-positive (1→3)-β-D-Gluicans 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-Gluacan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. J. Med. Mycology 56: 1001-1002.
- Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999: 1:247-261.
- Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New England Journal of Medicine. 1998: 338:1741-1751.
- Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H. Yasuoka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Gluacan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 345: 17-20.
- Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Micro. Rev. 9: 499-511.
- Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002: 4 (Suppl. 3):32-37
- Lass-Florl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.
- Nucci, M. and Anaissie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.
- Odobasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2004. β-Gluacan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199-205.
- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.
- Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., <, and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (13)-β-D-Gluacans. 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-Gluacans in the activation of coagulation factor G from *Limulus* amoebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.
- Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and Saito, H. 1993. Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-β-D-Gluacans: Comparison of the potency of gluacans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.
- Kanda, H., Kubo, K., Hamsasaki, 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-Gluacan level. Kidney International 60: 319-323.
- Kato, A., Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-β-D-Gluacan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
- Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Gluacan derived from different gauze types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.

- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-gluacan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
- Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T. and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-β-D-Gluacan in human blood. Clin. Chim. Acta 226: 109-112.
- Ogawa, M., Hori, H., Niiguchi, S., Azuma, E., and Komada, Y. 2004. False positive plasma (1→3)-β-D-Gluacan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. Int. J. Hematol. 80: 97-98.
- Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., and Steinbach, W.J. 2007. (1→3)-β-D-Gluacan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-gluacan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924-925.
- Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)-β-D-Gluacan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin. Inf. Dis. 41: 299-305.

MITTETSEERITUD LISAVIETED

- Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeken, E., De Munter, P., Meersseman, W., Van Meensel, B., Van Eldere, J., Lagrou K. 2009. Serum (1→3)-β-D-Gluacan as a diagnostic tool for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection or hematological malignancy. J. Clin. Microbiol. 47: 3871-3874.
- Koo, S., Bryar, J.M., Page, J.H., Baden, L.R., Marty, F.M. 2009. Diagnostic performance of the (1→3)-β-D-Gluacan assay for invasive fungal disease. Clin. Infect. Dis. 49:1650-9.
- Ellis, M., Ramadi, B., Finkelman, M., Hedstrom, U., Kristenson, J., Ali-Zadeh, H., and Klingspor, L. 2007. Assessment of the clinical utility of serial β-D-Gluacan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. J. Med. Microbiol. 57: 287-95.
- Marty, F.M., Lowry, C.M., Lemptsiki, S.J., Kubiak, D.W., Finkelman, M.A., and Baden, L. R., 2006. Reactivity of (1→3)-β-D-Gluacan assay with commonly used intravenous antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemo. 50: 3450-3453.
- Marty, F. M., Koo, S., Bryar, and J., and Baden, L.R. 2007. (1→3)-β-D-Gluacan assay positivity in patients with *Pneumocystis carinii* jirovecii pneumonia. Ann. Int. Med. 147: 70-72.
- Obayashi, T., Yoshida, M., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Kawai, T. 1992. Determination of plasma (1→3)-β-D-Gluacan: A new diagnostic aid to deep mycosis. J. Medical and Vet. Mysel. 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-Gluacan in human blood. Clinica Chimica Acta 226: 109-112.
- Yasuioka, A., Tachikawa, N., Shimada, K., Kimura, S., and Oka, S. 1996. (1→3)-β-D-Gluacan 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., Tsumoda, S., Suzuki, T., Muroi, K. Ohta, M., Sakamoto, S., and Miura, Y. 1997. Detection of plasma (1→3)-β-D-Gluacan 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-Gluacan in patients with pulmonary aspergillosis. Respiration 63: 78-83.

SÜMBOLITE SELGITUS

	Aegumiskuupäev
	Sisaldab N testi tegemiseks piisaval hulgal materjali
	Partii kood
	<i>In vitro</i> diagnostiline meditsiiniseade
	Kataloogi nr
	Temperatuuri piirang
	Tootja
	Lugege kasutusjuhendit
	Volitatud esindaja

CE EÜ märk

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