

Analüüsimetod (1→3)-β-D-glükaani määramiseks seerumist
FUNGITELL®
<i>Kasutusjuhend</i>
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536
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

Versioon 000, läbi vaadatud detsembris 2007.

OTSTARVE

Fungitelli analüüsimetod on proteaas sümgeenil 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 rakuseina põhikomponendi, (1→3)-β-D-glükaani seerumikontsentratsiooni võib kasutada abistava vahendina siivamükoooside ja fungeemiate diagnoosimisel. Positiivne tulemus ei näita seda, milline seente klass võib infektsiooni põhjuseks olla.

Analüüsimetod on näidustatud seeninfektsiooni kahtluse korral. Seda peab kasutama koos teiste diagnostiliste meetodite, näiteks mikrobioloogiliste külvide, bioptaatide histoloogiliste uuringute ja radioloogiliste uuringutega.

<p>Tähtis! Analüüsi tellivale arstile soovitatakse edastada järgmine info.</p>
<p>Fungitelli analüüsimetodiga ei saa tuvastada teatud seeneliike, näiteks nagu perekonna <i>Cryptococcus</i> (9) liike, mis toodavad (1→3)-β-D-glükaani väga väikestes kogustes. Analüüsimetodiga ei saa tuvastada sügomütsete, näiteks perekondade <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> ja <i>Rhizopus</i> (17) liike, mis teadaolevalt ei tooda (1→3)-β-D-glükaani. Ka <i>Blastomyces dermatitidis</i> toodab pärmseene faasis (1→3)-β-D-glükaani vähe, mistõttu ei pruugi see organism olla analüüsimetodiga tuvastatav (18).</p>
<p>Lisage see teade väljastatavatele glükaani analüüsitulemustele.</p>

KOKKUVÖTE JA SELGITUS

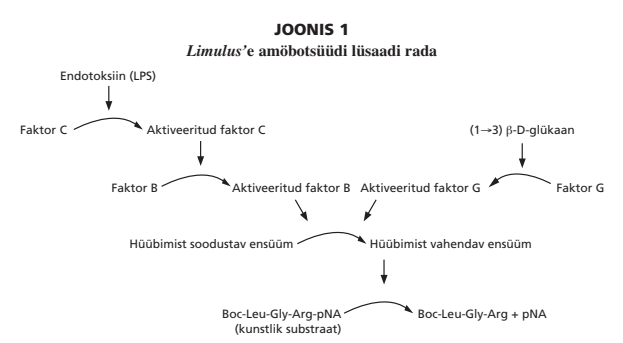
Nii primaarsete kui ka oportunistlike patogeenide põhjustatud seeninfektsioonide esinemissagedus suureneb pidevalt, eriti immuunpuudulikkusega patsientidel (2,3,4). Invasiivsed seeninfektsioonid kui oportunistlikud infektsioonid on sagedad pahaloomuliste hematoloogiliste kasvajate ja AIDSiga patsientide puhu ning moodustavad üha suureneva osa hospitaalinfektsioonidest, seda eriti elundi siirdamise läbi teinud patsientidel ja teistel immuunsuppressantravi saavatel patsientidel (1,4). Paljud seenhaigused saadakse maapinnast, taimede jääkidelt, õhukaitlussüsteemidelt ja/või eksponeeritud pindadel pärinevate seeneeoste sissehingamisel. Mõned oportunistlikud seened esinevad inimese nahal või nahas, seedetraktis ja limaskestadel (7). Invasiivsete mükoooside ja fungeemiate diagnoos põhine peamiselt mittespetsiifistel või radioloogilistel meetoditel.

Sagedased primaarsed seenpatogeenid inimesel on *Candida* spp ja *Aspergillus* spp. Oportunistlike seenpatogeenide hulka kuuluvad *Fusarium* spp, *Trichosporon* spp, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schencki* ja *Pneumocystis carinii*. Fungitelli analüüsimetodiga on võimalik tuvastada neis ja teistes organismides toodetud (1→3)-β-D-glükaani.

PROTSEDUURI PÕHIMÖTE

Fungitelli analüüsimetod moodab (1→3)-β-D-glükaani taset seerumis. Meetod põhineb *Limulus*’e amöbotsüüdi lüsaadi (LAL) raja modifikatsioonil (8-11), 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 seriini proteaas sümgeen. Aktiveeritud faktor G muundab inaktiivse hüübimist soodustava ensüümi aktiivseks hüübimist vahendavaks ensüümiks, mis omakorda eraldab kromogeense peptiidsubstraadi Boc-Leu-Gly-Arg-pNA küljest pNA fragmendi, luues kromofoori, milles neeldub valgus lainepikkusega 405 nm. Allpool kirjeldatud Fungitelli kineetilise analüüsimetod põhineb proovis tekitatud optilise tiheduse suurenemise kiiruse määramisel. Kiirust tõlgendatakse vastavalt standardkõverale, mille tulemusena saadakse hinnanguline (1→3)-β-D-glükaani kontsentratsioon proovis.



FUNGITELLI KOMPLEKTIGA KAASAS OLEVAD MATERJALID

Fungitelli komplekt on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Ühes komplektis olevaid järgmisi materjale jätkub 110 augu analüüsimiseks kahel mikrotiterplaadil (55 auku kummalgi plaadil).

- Fungitell® reaktiiv, lüofiliseeritud (1→3)-β-D-glükaani suhtes spetsiifiline LAL (kaks viali).
- Pürosooli lahustamispuhver, Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4 (kaks viali).
- Glükaani standard, lüofiliseeritud Pachyman ja inertne täitja etiketile märgitud (1→3)-β-D-glükaani sisaldusega (kaks viali).
- Reaktiivi kvaliteediga vesi (kaks pudelit).
- Püroplaadid: sileda pinnaga 96 auguga katmata ja kaanega mikroplaadid, mis ei sisalda häirivaid glükaane (kaks).
- KCl 1,2 M (üks viaal).
- KOH 0,25 M (üks viaal).

Mitte ükski ülalolettud 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 - kategooria # PPT25, 1000 µl - kategooria # PPT10).
- Pipetid, millega saab mõõta 5...25 µl ja 100...1000 µl mahte.
- Reguleeritav automaatipipett koos süstlaotsikutega, millega saab mõõta 100 µl mahtu.
- Katsutid* standardseeria valmistamiseks ja seerumi töötluse reaktiividega segamiseks (13 x 100 mm borosilikaatklaas, kategooria # 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.
- Sterilised glükaanivabad keeratava korgiga säilituskatsutid proovide jagamiseks (enamik katsuteid, 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! Puuvillatoppidega klaaspipetid 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 tehniku põhjalik väljaõpe ja saastumise vältimine on analüüsimetodi tõhusaks kasutamiseks kriitilise tähtsusega.</p>

- Fungitelli analüüsimetodiga mittetuvastatavad liigid. Teatud seeneliigid toodavad (1→3)-β-D-glükaani väga vähe ning ei ole Fungitelli analüüsimetodiga enamasti tuvastatavad. Nende hulka kuuluvad perekond *Cryptococcus* (14,16), kuid ka sügomütseid, näiteks *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus* (16,17). Lisaks toodab ka *Blastomyces dermatitidis* pärmseene faasis (1→3)-β-D-glükaani vähe ning ei ole seetõttu tavaliselt Fungitelli analüüsimetodiga tuvastatav (18).
- 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 muustrite suhtes.
- Patsiendi proovide käitlemisel kasutage sobivat kaitseriietust ja talgivabu kindaid.
- Hemodialüüsi saavate patsientide seerum võib teatud dialüüsi tselluloosembraanide kasutamisel sisaldada suures koguses (1→3)-β-D-glükaani (13). Tselluloosriistsetaat- või polümetüülmetakrülaatembraanide kasutamine hemodialüüsil näib analüüsi tegemist mittemõjutavat.
- Kirurgilistest tamponidest 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 (6).
- Kahjustatud sisuga komplekte ei tohi kasutada.
- Potentsiaalselt saastunud (patogeeni sisaldavate) vedelikega kokku puutunud materjalid peab hävitama vastavalt kohalikele regulatsionidele.

Reaktiivide säilitamine

Hoidke kõiki reaktiive tarnitud kujul temperatuuril 2...8 °C pimedas. Lahustatud Fungitelli reaktiivi tuleb hoida temperatuuril 2...8 °C ja kasutada 2 tunni jooksul. Lahustatud 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 steriilsesse vaakumkatsutisesse (punase korgiga) või seerumi eraldamise katsutisesse 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.
- 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 kiirusena kõigi kogutud andmepunktide jaoks. Optilise tiheduse lugemite vaheline aeg peab olema vahemikus 15...30 sekundit. 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 sekundi jooksul. Kõvera kuju seadistus peab olema lineaarne/lineaarne või sellele vastav. Mõõtmised peavad algama viivitusajata.

- Komplektis oleva glükaani standardi valmistamine.
 - Lahustage üks viaal glükaani standardit vialil näidatud koguse reaktiivi kvaliteediga veega, et saada lahus kontsentratsiooniga 100 pg/ml. Resuspendeerimiseks segage lahus (lahus 1) vähemalt 30 sekundit automaatmikseril. Glükaani lahus 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 lahus 1. Segage automaatmikseril vähemalt 10 sekundit.
 - Valmistage standard kontsentratsiooniga 25 pg/ml (lahus 3), segades glükaanivabas katsutis 500 µl reaktiivi kvaliteediga vett ja 500 µl lahus 2. Segage automaatmikseril vähemalt 10 sekundit.
 - Valmistage standard kontsentratsiooniga 12,5 pg/ml (lahus 4), segades glükaanivabas katsutis 500 µl reaktiivi kvaliteediga vett ja 500 µl lahus 3. Segage automaatmikseril vähemalt 10 sekundit.
 - Valmistage standard kontsentratsiooniga 6,25 pg/ml (lahus 5), segades glükaanivabas katsutis 500 µl reaktiivi kvaliteediga vett ja 500 µl lahus 4. Segage automaatmikseril vähemalt 10 sekundit.
- Seerumi eeltõõtlusreaktiivi valmistamine. Aluseline seerumi eeltõõtlusreaktiiv muudab kolmikheeliksiga glükaanid üheahelalisteks glükaanideks (10,11), mis on analüüsi tegemiseks reaktiivsemad. Kõrge pH inaktiveerib ka seerumi seriini proteaasi ja seriini proteaasi inhibiitorid, mis võivad põhjustada vastavalt valepositiivsete või valenegatiivsete tulemuste saamise (20).
 - Valmistage seerumi eeltõõtlusreaktiiv, lisades koguses 0,25 M KOH ja 1,2 M KCl lahus ning segades automaatmikseril korralikult. 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 korrutage 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 augu kohta või viis korda rohkem kui seerumi proovi kogus. Mikrotiterplaad standardite (St)negatiivse kontrollidega (Neg) ja 21 teadmata (Pr), mida kõike analüüsitakse kahekordselt, seatakse üles järgmise skeemi alusel.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		St1	St1		Pr1	Pr4	Pr7	Pr10	Pr13	Pr16	Pr19	
C		St2	St2		Pr1	Pr4	Pr7	Pr10	Pr13	Pr16	Pr19	
D		St3	St3		Pr2	Pr5	Pr8	Pr11	Pr14	Pr17	Pr20	
E		St4	St4		Pr2	Pr5	Pr8	Pr11	Pr14	Pr17	Pr20	
F		St5	St5		Pr3	Pr6	Pr9	Pr12	Pr15	Pr18	Pr21	
G		Neg	Neg		Pr3	Pr6	Pr9	Pr12	Pr15	Pr18	Pr21	
H												

Märkus 1. Välimisi auke võib kasutada, kui on näidatud, et välimistes aukudes saadud tulemused on võrreldavad sisemiste aukude tulemustega. Märkus 2. Juhusliku saastumise vältimiseks pange mikroplaadi kaas tagasi pärast proovide ja reaktiivide aukdesse lisamist. Eemaldage kaas enne plaadi lugejasse panemist kondenseerumisest tekkivate optiliste häirete vältimiseks.

- Seerumi ja eeltõõtlusreaktiivi lisamine.
 - Sulatage seerumi külmutatud proovid toatemperatuuril. Segage proovid automaatmikseril korralikult.
 - Viige 5 µl seerumi proovi vähemalt kahte vastavase auku (Uk). Korrake seda tegevust iga seerumi proovi korral.
 - Lisage 20 µl seerumi eeltõõtlusreaktiivi igasse seerumit sisaldavase auku. Märkus. Etapid b ja c võib läbi viia vastupidises järjekorras vastavalt tehniku eelistetele.
 - Liigutage plaati 5...10 sekundit aukude sisu segamiseks (kasutada võib lugeja plaadi liigutamise funktsiooni) ja seejärel inkubeerige 10 minutit inkubatsiooni plaatlugejas temperatuuril 37 °C.
- Fungitelli reaktiivi lahustamine. Märkus. Seda on mugav teha eeltõõtlusinkubatsiooni toimumise ajal.
 - Lahustage üks viaal Fungitelli reaktiivi, lisades 1000 µl pipetiga 2,8 ml reaktiivi kvaliteediga vett ja seejärel lisades 2,8 ml pürosooli lahustamispuhvrit. Katke viaal Parafilmi Parafilmi selle poolega, mis oli paberlase poole suunatud. Keerutage vialil õrnalt täieliku lahustumise saamiseks. Ärge kasutage automaatmikserit.
 - Negatiivsete kontrollide ja glükaani standardite lisamine. Seerumi eeltõõtlusinkubatsioni (etapp 3.d) lõpus võtke plaat inkubatsioni plaatlugejast välja ja lisage plaadile standardid ja negatiivsed kontrollid.
 - Lisage 25 µl reaktiivi kvaliteediga vett aukdesse G2 ja G3.
 - Lisage 25 µl 6,45 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahus 5 aukdesse F2 ja F3.
 - Lisage 25 µl 12,5 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahus 4 aukdesse E2 ja E3.
 - Lisage 25 µl 25 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahus 3 aukdesse D2 ja D3.
 - Lisage 25 µl 50 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahus 2 aukdesse C2 ja C3.
 - Lisage 25 µl 100 pg/ml kontsentratsiooniga standardi lahus 1 aukdesse B2 ja B3.
- Fungitelli reaktiivi lisamine ja plaadi inkubeerimise protseduur.
 - Lisage reguleeritava automaatipipetiga kõigisse (negatiivsed kontrolle, standardeid ja proove sisaldavatesse) aukdesse 100 µl Fungitelli reaktiivi.
 - Pange kaanega plaat mikroplaadi lugejasse (mis on viitud temperatuurile 37 °C) ja raputage 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 aktspeeritav ka mõõtmiste tegemine ainult lainepikkusel 405 nm. Kui kasutada ei ole võimalik mikroplaadi lugeja plaadi raputamise funktsiooni, võib kasutada välist mikroplaadi raputajat.
 - Koguge andmed ja analüüsige järgmise skeemi alusel. 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 pikogrammes milliliitris ja vahemikus alates mittemääratavast (<31 pg/ml) kuni väärtusen>500 pg/ml ning need printidakse välja tarkvara abil või loetakse standardkõveralt. Täpsete tulemuste saamiseks kontsentratsioonil üle 500 pg/ml on vajalik proovi lahgendamine reaktiivi kvaliteediga veega ja uus analüüsimine.

Analüüsi tegev labor peab teavitama analüüsi tellivat arsti, et Fungitelli analüüsimeetod ei tuvasta teatud seenelike, näiteks nagu perekonna *Cryptococcus* (16,17) liike, mis toodavad (1→3)-β-D-glükaani väga väikeses kogustes. Analüüsimeetodiga ei saa tuvastada ka sügomüt-seete, näiteks perekondade *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus* (16,17) 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 analüüisiga tuvastatv (18).

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.

VAAHEPEALNE 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.
- Tühjad aused (sisaldavad 25 µl reaktiivi kvaliteediga vet) on negatiivsed kontrollid. Negatiivseid kontrollide tegelikud optilise tiheduse muutumise kiiruse (Vmean) väärtused peavad olema väiksemad kui 50% kõige väiksema kontsentratsiooniga standardi väärtustest. Vajaduste tuleb analüüsi korrata kõigi uute reaktiividega.
- Probleemsete proovide käitlemine. Kui laborant märkab sogsaid, kahtlase värvusega või hägusaid, näiteks olulise hemolüüisiga, lipeemilisi või liigselt bilirubiini sisaldavaid proove, tuleb proovi lahjendada reaktiivi kvaliteediga veega ja uuesti analüüsida. Lahjendust peab tulemuste esitamisel arvestama ning tulemused tuleb korrutada lahjendusteguriga. Tavaliselt sisestatakse lahjendustegur proovi tarkvaraseadistustesse ja korrektsioon toimub automaatselt.
- Reaktiivide ja analüüsimeetodi õige toimimise kontrollimiseks võib analüüsida kontroll-proove 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 sisemine vereringesse võib mõjutada võimet tuvastada teatud seeninfektsioone. *Cryptococcus* spp toodab (1→3)-β-D-glükaani väikeses koguses raku kapseldumise tõttu (11). Sügomütseedid, sealhulgas *Absidia*, *Mucor* spp ja *Rhizopus* spp (16,17) (1→3)-β-D-glükaani teadaolevalt ei tooda (16,17). *Blastomyces dermatitidis* toodab pärmsene faasis (1→3)-β-D-glükaani vähe ning testitulemused on seetõttu tavaliselt negatiivse (18).
- Mõnedel inimestel esinevad kõrgenenud (1→3)-β-D-glükaani tasemed vahepealsete väärtuste tsooni jäävates kontsentratsioonides. Sellistel juhtudel on soovitatavad 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 (12,13), teatud fraktsioneeritud vereotodetega, näiteks seerumi albumiini ja immuunglobuliinidega (19) ravitud patsientidel ja glükaani sisaldavate tamponidega 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 (6). Seetõttu tuleb kirurgiliste patsientide proovide võtmisel seda asjaolu arvesse võtta.
- Kanna või sõrme kapillaarvere punktsiooni saadud proovide kasutamine ei ole sobilik, sest niidatud on proovide saastumine uuringukoha ettevalmistamiseks kasutatava alkoholis niisutatud tamponiga (ja potentsiaalselt ka vere kogumiseiga nahapinnale).
- Testitulemused on määratud täiskasvanud patsientidel. Imikute ja laste normaalsed tasemed on ligilähedased täiskasvanud patsiendite väärtustele (21). Andmed vastsündinute ja nooremate kui 6kuuste 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.

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

Beetagliikaani väärtused on tõusnud mitmete seeninfektsioonide korral. Kui 80 pg/ml või kõrgema väärtuse korral esinevad infektsiooni tunnused ja sümptomid, on seeninfektsiooni olemasolu ennustav väärtus uritaval 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 analüüsimeetodi omaduste valideerimiseks viidi läbi mitmekesuseline prospektiivne uuring. Analüüsimeetodit võrreldi mükooside ja fungeemiate tuvastamise teiste standardsete meetoditega (nt verekitlv, bioptaatide histoloogiline uurimine ja radioloogilised tunnused).

Analüüsimeetodiga uuriti 359 uuritavat. Kõigilt uuritavatel 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 kuue kliinilises keskuses. Neljas kliinilises keskuses analüüsiti 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.

Tundlikkus kogu uuritavate populatsioonis (359), sealhulgas *Cryptococcus*'e korral, oli 65,0% (usalduspiirid 60,1...70,0%). Spetsiifilisuus oli 81.1% (usalduspiirid 77,1...85,2%) (tabel 1). Nelja uuringukoha tulemuste tundlikkuse vahemik oli 50,0...66,7%. 285 analüüsitud proovi spetsiifilisuus 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	Spetsiifilisuus <60 pg/ml					Vähepealne 60 ≤ X < 80	Kokku
		Positiivne / kliiniliselt positiivne	Tundlikkus	Positiivne ennustav väärtus	Negatiivne / kliiniliselt negatiivne	Spetsiifilisuus		
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 tundlikkus ACC jaoks 64,3% (usalduspiirid 58,8...69,9%) ja uuringukohtade jaoks 61,5% (usalduspiirid 55,0...67,2%). Spetsiifilisuus oli ACC jaoks 86,6% (usalduspiirid 82,7...90,6%) ja uuringukohtade jaoks 79,6% (usalduspiirid 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	Spetsiifilisuus <60 pg/ml					Vähepealne 60 ≤ X < 80	Kokku
		Positiivne / kliiniliselt positiivne	Tundlikkus	Positiivne ennustav väärtus	Negatiivne / kliiniliselt negatiivne	Spetsiifilisuus		
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 analüüisiga saadi positiivne tulemus 83 uuritaval 107st.

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

ASPERGILLOOS

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

FUSARIOOS

Kolmel uuritaval oli fusarioosi diagnoos. Analüüisiga 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. Analüüisiga saadi positiivne tulemus 82 uuritaval (tundlikkus 69,5%, usalduspiirid 61,2...77,8%). Lisaks sellele esines invasiivne seeninfektsioon 24 uuritaval, kes seenevastast ravi ei saanud. Analüüisiga saadi positiivne tulemus 18 uuritaval (tundlikkus 75%, usalduspiirid 57,7...92,3%).

SPETSIIFILISUS

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

ANALÜÜSITULEMUSTE KORRELEERUMINE

Neljas kliinilises keskuses analüüsiti ja uuriti kokku 285 proovi. Uuringukohtade analüüsitulemused korreleerusid 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 analüüsiti kümmet (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.












- Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002; 4 (Suppl. 3):32-37.
- Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999; 1:247-261.
- Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New England Journal of Medicine. 1998; 338 (24):1741-1751.
- Obayashi, et.al. Plasma (1,3)-beta-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 1995: 345:17-20.
- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2004) -Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199-205.
- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2005) A prospective pilot survey of B-g 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* 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-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.

MITTETSITEERITUD LISAVIITED

- 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.

SÜMBOLITE SELGITUS

	Aegumiskuupäev
	Sisaldab N testi tegemiseks piisaval hulgal materjali
	Partii kood
	In vitro diagnostiline meditsiinisead
	Kataloogi nr
	Temperatuuri piirang
	Tootja
	Lugege kasutusjuhendit
	Volitatud esindaja
	EÜ märk
	Associates of Cape Cod® International, Inc. Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, UK (Suurbritannia)