

## (1→3)-β-D-glukaanin analyysi seerumista

<b>FUNGITELL®</b>	
<b>Käyttöohjeet</b>	
<p><b>ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED</b></p> <p>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536</p>	<p>Puhelinnumero: +1 508 540-3444</p> <p>Maksuton numero:+1 888 395-2221</p> <p>Faksi: +1 508 540-8680</p> <p>Tekninen tuki: +1 800 848-3248</p> <p>Asiakaspalvelu: +1 800 525-8378</p>
PN001268-fi	Versio 000, joulukuu 2007

### KÄYTTÖTARKOITUS

Fungitell-analyysi on proteaasin tsmogeeniin pohjautuva kolorimetrisen analyysi (1→3)-β-D-glukaanin kvantitatiiviseksi tunnistamiseksi seerumista, jos potilaalla on tai epäillään olevan invasiivinen sieni-infektio. (1→3)-β-D-glukaani on monien lääketieteellisesti merkittävien sienien keskeinen solun seinämien rakenneosa. Sen auttaa tunnistamaan kudostensisäiset mykoosit ja fungemiat. Positiivinen tulos ei ilmaise, mikä sieni aiheuttaa infektion.

Analyysi on tarkoitettu sieni-infektion alustavan diagnoosin tekemiseksi. Sitä on käytettävä yhdessä muiden diagnoosimenetelmien kanssa, kuten mikrobiologisen viljelyt, kudonsäytteiden histologisen tutkimisen ja radiologisten tutkimusten kanssa.

<p><b>On tärkeää antaa nämä tiedot hoitavalle lääkärille:</b></p>
<p>Fungitell-analyysi ei tunnista tiettyjä sienilajeja, esimerkiksi <i>Cryptococcus</i> (9) -sukuun kuuluvia, sillä ne tuottavat (1→3)-β-D-glukaania erittäin vähän. Analyysi ei myöskään tunnista tiettyjä homesieniä, kuten <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> ja <i>Rhizopus</i> (17), sillä niiden ei tiedetä tuottavan (1→3)-β-D-glukaania. Myös <i>Blastomyces dermatitidksen</i> hiivavaihe tuottaa vain vähän (1→3)-β-D-glukaania, joten analyysi ei ehkä tunnista sitä (18).</p>
<p><b>Ilmoita nämä tiedot raportoidessasi glukaanianalyysin tulokset.</b></p>

### YHTEENVETO JA SELVITYS

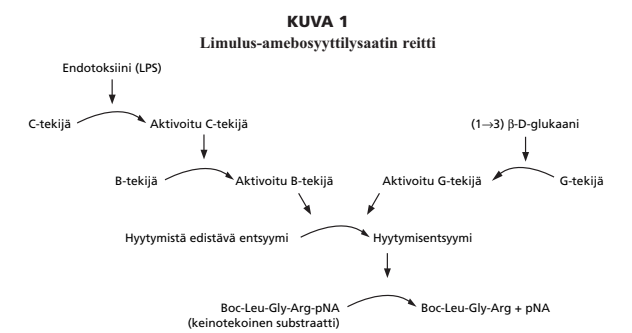
Ensisijaisista ja opportunistisista patogeeneista yhä useammat ovat sieni-infektioita, varsinkin potilailla, joiden immuunipuolustusjärjestelmän toiminta on heikentynyt (2, 3, 4). Invasiiviset sienitaudit ovat yleisiä opportunistisina infektioina vakavista hematologisista sairauksista kärsivien ja AIDS-potilaiden keskuudessa. Ne aiheuttavat yhä enemmän nosokomiaalisia infektioita varsinkin elinsiirtojen saajilla ja muilla potilailla, jotka saavat immuunipuolustusjärjestelmän toimintaa heikentävää lääkitystä (1, 4). Monet sienitaudit saavat alkunsa hengitettäessä sieni-itiöitä, jotka ovat lähtöisin maaperästä, kasvijätteistä, ilmkäsittelyjärjestelmistä ja/tai altistuneista pinnoista. Tiettyjä opportunistisia sieniä esiintyy ihmisen iholla, ruoansulatuskanavassa ja limakalvoilla. Invasiivisten mykoosien ja fungemioiden diagnoosi perustuu tavallisesti epäspesifiseen diagnoosiin tai radiologisiin tekniikoihin.

*Candida* spp. ja *Aspergillus* spp. ovat ihmisellä tavallisia patogeeneja. *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Sacharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* ja *Pneumocystis carinii* ovat opportunistisia patogeenisieniä. Fungitell-analyysi tunnistaa nämä ja muut organismit niiden tuottaman (1→3)-β-D-glukaanin perusteella (4,5, 16).

### TOIMINTAPERIAATE

Fungitell-analyysi mittaa (1→3)-β-D-glukaanin määrää. Analyysi perustuu muokatusn *Limulus*-amebosyyttilysaatin (LAL) estäjään (8-11), kuva 1. Fungitell-reagenttia on muokattu C-tekijän eliminoimiseksi, joten se reagoi vain (1→3)-β-D-glukaaniin reitin G-tekijän puoleen.

(1→3)-β-D-glukaani aktivoi G-tekijän, joka on seriniiniproteaasin tsmogeeni. Aktivoitu G-tekijä muuntaa passiivisen hyttymistä edistävän entsyymin aktiiviseksi hyttymisentsyymiksi, joka puolestaan pilkkoo kromogeenisen peptisen aineen Boc-Leu-Gly-Arg-pNA:n pNA:ta. Näin syntyyvä kromofori imeytyy aallonpituudella 405 nm. Jäljempänä kuvattava kineettinen Fungitell-analyysi perustuu näytteen optisen tiheyden muuttumiseen. Tätä arvoa tulkitaan vakiokäyrää vasten näytteen (1→3)-β-D-glukaanikonsentraation määrän selvittämiseksi.



### FUNGITELL-SARJAN SISÄLTÖ

Fungitell-sarja on tarkoitettu *in vitro* -diagnostiikkaan. Kunkin sarjan sisältämät materiaalit riittävät kahden mikroitrauslevyn 110 syvennyksen analysoimiseen (molemmissa levyissä on 55 syvennystä):

- Fungitell®--reagenssi, pakastekuivattua (1→3)-β-D-glukaanille spesifiä LAL-lysaattia (kaksi koeputkea)
- Pyrosol-puskurialainetta käyttövalmiin nesteen valmistamiseksi, Tris HCl 0.2 M pH 7.4 (kaksi koeputkea)
- Glukaanivakioita, pakastekuivattua kokovalvoa ja reagoimatonta täyteainetta, (1→3)-β-D-glukaanisisältö näkyv kahden koeputken etiketeissä
- Reagenssivettä (RGW) (kaksi pulloa)
- Tulenkestävät levyt: Tasainen pohja, 96 syvennystä, päällystämättömät kannelliset mikrolevyt, ei interferoivia glukaaneita (kaksi)
- KCl 1.2 M (yksi koeputki)
- KOH 0.25 M (yksi koeputki)

Missään näistä ei ole interferoivaa määrää (1→3)-β-D-glukaania glukaanivakioita lukuun ottamatta.

### TARVITTAVAT MUUT MATERIAALIT

Missään materiaalissa ei saa olla glukaania. Lasiesineitä on kuumentettava kuivina pyrogeenittomiksi ainakin lämpötilassa 235 °C seitsemän tuntia, jotta niitä voidaan käyttää.

- Pipettien kärjet\* (250 µL - Cat# PPT25, 1000 µL - Cat# PPT10)
- Pipettien on pystyttävä toimittamaan 5-25 µL ja volyymejä 100-1000 µL.
- Ruiskukärjillä varustettujen Stepper-pipettien on pystyttävä toimittamaan 100 µL.
- Koeputkia\* vakiosarjajavalmistelu ja seerumihoitoreagenssien yhdistämistä varten. (13 x 100 mm:n boorisilikaattilasi - Cat# TB013)
- Inkubointilevyn (37 °C) luku-laite, joka pystyy tarkkailemaan kahta aallonpituutta: 405 ja 490 nm. Dynaamisen alueen on oltava vähintään 2,0 absorbointiyksikköä yhdistettyinä sopivaan tietokonepohjaiseen kineettiseen analysointiohjelmaan.
- Sterileitä glukaanittomia kierrekorkilla varustettuja näytteiden säilytysputkia (useimmissa pyrogeenittomissa RNase- ja DNase-putkissa ei ole (1→3)-β- D-glukaania).
- Parafilm®

\*Näissä Associates of Cape Cod, Inc:n (ACC) toimittamissa tuotteissa ei ole glukaaneita. **Varoitus:** puuvillatulpilla varustetut lasipipetit voivat aiheuttaa glukaanikontaminaation.

### VAROITUKSET JA VAROTOIMET

**Tämä tuote on tarkoitettu DIAGNOSTISEEN IN VITRO -KÄYTTÖÖN.**

<p>Fungitell-analyysi asettaa tiukat vaatimukset tekniikalle ja testausympäristölle. Analyysin onnistuminen edellyttää, että laborantit koulutetaan hallitsemaan analyysimenetelmä ja estämään kontaminaatio.</p>
---

- Lajit, joita Fungitell-analyysi ei tunnista: Tietyt sienilajit tuottavat (1→3)-β-D-glukaania erittäin vähän, joten Fungitell-analyysi ei yleensä tunnista niitä. Niitä ovat *Cryptococcus*-suku (14, 16) ja tsgomykeetit, kuten *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus* (16,17). Myös *Blastomyces dermatitidksen* hiivavaihe tuottaa vain vähän (1→3)-β-D-glukaania, joten Fungitell-analyysi ei yleensä tunnista sitä (18).
- Älä pipetoi mitään materiaaleja käyttämällä suuta.. Älä tupakoi, syö tai juo paikoissa, joissa näytteitä tai reagensseja käsitellään.
- Analyysi on tehtävä puhtaassa ympäristössä. Käytä materiaaleja ja reagensseja, joissa ei ole häiritsevää määrää (1→3)-β-D-glukaania. Huomaa, että glukaani sekä ihmiskehon, vaatteiden, astioiden, veden ja ilman kautta tuleva sienikontaminaatio voi vaikuttaa Fungitell-analyysin tuloksiin.
- Älä käytä vanhentuneita reagensseja.

- Värjäytyneet, sameat, voimakkaasti hemolysoituneet, lipeemiset tai runsaasti bilirubiinia sisältävät näytteet voivat vaikuttaa analyysin tuloksiin. On tarkistettava, että koetuloksissa ei ole näkyviä häiriöitä eikä epätavallisia kineettisiä jälkiä.
- Käytä tarvittavaa suojavaatetusta ja jauheettomia käsiaineitä käsitellessäsi potilasnäytteitä.
- Hemodialyysipotilaiden seerumissa voi olla suuria määriä (1→3)-β-D-glukaania käytettäessä tiettyjä selluloosapohjaisia dialyysikalvoja (13). Hemodialyysi selluloosatriasetaattikalvojen tai polymetyylimetakrylaattikalvojen avulla ei vaikuta analyysituloksiin.
- Kirurgisissa sideharsoissa ja sienissä voi olla runsaasti (1→3)-β-D-glukaania. Siksi leikkauksessa olleille potilaille tehdyissä Fungitell-analyyseissä on saatu positiivisia tuloksia kontaminaation vuoksi.
- Sarjaa ei saa käyttää, jos sen sisältö on vaurioitunut.
- Mahdollisesti kontaminoituneille (patogeenejä sisältäville) nesteille altistuneet materiaalit on hävitettävä paikallisten määräysten mukaisesti.

#### Reagenssien säilyttäminen

Kaikkia toimitettuja reagensseja on säilytettävä pimeässä ja lämpötilassa 2–8 °C. Käyttövalmiita Fungitell-reagenssineiteitä on säilytettävä lämpötilassa 2–8 °C. Ne on käytettävä kahden tunnin kuluessa. Käyttövalmiita Fungitell-reagenssineiteitä voidaan säilyttää pakastettuina lämpötilassa -20 °C jopa 20 päivän ajan. Ne on käytettävä sulattamisen jälkeen.

#### Näytteiden käsitteleminen

- Näytteiden ottaminen: Seeruminäytteet on kerättävä steriileihin tyhjiöputkiin (punainen korkki) tai seeruminerotusputkiin. Näytteiden on annettava hytyä. Seerumi erotellaan hyttyneestä massasta ja dekantoidaan tarkoitukseen soveltuvaan astiaan, jossa ei ole (1→3)-β-D-glukaania.
- Näytteiden säilyttäminen: Seeruminäytteitä voidaan säilyttää lämpötilassa 2–8 °C ennen analysointia, tai ne voidaan pakastaa lämpötilassa -20 °C tai kylmemmässä.
- Näytteiden merkitseminen: Näytteet on merkittävä selkeästi valitsevan käytännön mukaisesti.

#### TOIMINTA

Huomautus: Toimenpiteet voivat vaihdella käytettävien laitteiden ja ohjelmiston mukaan. Yleensä toimitaan seuraavasti. Määritä Platerreader-ohjelmisto keräämään tietoja Vmeantilassa. Tarkista oikeat asetukset ohjelmiston käyttöohjeesta sen varmistamiseksi, että laskettava arvo on kaikkien tietopisteiden optisen tiheyden muutoksen keskiarvo. Tiheys on luettava optisesti 15–30 sekunnin alueella. Ohjelmiston aallonpituusasetukseksi on valittava 405 nm vähennettynä taustan 490 nm:llä. Jos kahta aallonpituutta ei voi lukea, valitse 405 nm. Inkubointilämpötilan tulee olla 37 °C. Levyä on ravisteltava 5–10 sekunnin ajan ennen lukemisen aloittamista. Käytän sovitussasetuksen tulee olla lineaarinen/lineaarinen tai vastaava. Lukeminen on aloitettava viivytyksettä.

- Valmistele sarjan mukana toimitettu glukaanivakio.
  - Luota yksi koeputkellinen glukaanivakioita koeputkessa ilmoitettuun määrään reagenssivettä. Näin syntyy 100 pg/mL:n liuos. Heiluttele putkea pyöremäisesti vähintään 30 sekuntia. Näin syntyy liuos 1. Glukaaniliuos on säilytettävä lämpötilassa 2–8 °C ja käytettävä kolmen päivän kuluessa. Vaiheissa b– jäljempänä kuvataan käyränvalmisteluvaihe.
  - Valmista 50 pg/ml:n vakoliousta sekoittamalla 500 µL reagenssivettä ja 500 µL liuosta 1 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 2. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
  - Valmista 25 pg/ml:n vakoliousta sekoittamalla 500 µL reagenssivettä ja 500 µL liuosta 2 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 3. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
  - Valmista 12,5 pg/ml:n vakoliousta sekoittamalla 500 µL reagenssivettä ja 500 µL liuosta 3 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 4. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
  - Valmista 6,25 pg/ml:n vakoliousta sekoittamalla 500 µL reagenssivettä ja 500 µL liuosta 4 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 5. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
- Valmista seerumin esikäsittelyreagenssi. Alkalinen seerumin esikäsittelyreagensi muuntaa kolmekierteiset glukaanit yksijaksoisiksi glukaaneiksi (10, 11), jotka reagoivat analyysissa helpommin. Korkea pH myös passivoi seerumin seriniiniproteaasit ja seriniinipteaasien estäjät. Edellä mainitut voivat aiheuttaa virheellisen positiivisen ja jälkimmäiset virheellisen negatiivisen tuloksen (20).
  - Valmista seerumin esikäsittelyreagenssi yhdistämällä yhtä suuret määrät 0.25 M KOH:ia ja 1.2 M KCl:ää. Sekoita hyvin. Reagenssien suositeltu määrä on 900 µL kahta kertaa varten. Peitä koeputket Parafilmillä käytettäväksi yhdessä toisen levyn kanssa. Peitä koeputki Parafilmillä käyttämällä Parafilmin sitä puolta, joka oli taustapaperia vasten.

- Huomautus: Kun vakiokäyrää piirretään, jaa vakiokonsentraatiot viidellä, jotta alue on 500–31 pg/mL. Syötä vakiot ohjelmiston asetuksiin vastaavasti arvoina 500, 250, 125, 62,5 ja 31 pg/ml.

*Analyyssissä käytettävä vakiomäärä on 25 µL syvennystä kohden tai viisi kertaa seeruminäytteen määrä. Mikroitrauslevyissä on tavallisia (St), negatiivisia (Neg), ja 21 tuntematonta (Uk). Ne analysoidaan kahteen kertaan seuraavasti:*

	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												

Huomautus 1: Ulompia syvennyksiä voidaan käyttää, jos on osoitettu, että ne toimivat yhtä hyvin kuin sisemmät syvennykset. Huomautus 2: Kontaminaation välttämiseksi vaihda mikrolevyn kansi, kun näytteet ja reagenssit on lisätty syvennyksiin. Poista kansi ennen levyn asettamista lukulaitteeseen tiivistyväseen höyryn aiheuttaman poisteen häiriön välttämiseksi.

- Lisää seerumi ja sen esikäsittelyreagenssi.
  - Sulata pakastetut seeruminäytteet huoneenlämpöisiksi. Sekoita kaikki näytteet hyvin.
  - Siirrä 5 µL seeruminäytettä niille tarkoitettuihin syvennyksiin (Uk) ainakin kaksinkertaisena määränä. Toista toiset kaikille seeruminäytteille.
  - Lisää 20 µL seerumin esikäsittelyreagenssia seerumia sisältäviin syvennyksiin. *Huomautus:* Vaiheet b ja c voidaan haluttaessa tehdä vastakkaisessa järjestyksessä.
  - Sekoita levyä 5–10 sekuntia syvennyksen sisällön sekoittamiseksi (lukulaitteen levynsekoitustoimintoa voidaan käyttää). Inkuboi 10 minuuttia lämpötilassa 37 °C levynlukulaitteessa.
- Valmistaa käyttövalmis Fungitell-reagenssi. Huomautus: Tämä vaihe voidaan tehdä esikäsittelyn inkuboinnin ollessa meneillään.
  - Valmista koeputkellinen Fungitell-reagenssia lisäämällä 2,8 ml reagenssivettä ja lisäämällä 2,8 ml Pyrosol-puskurialainetta. Käytä 1000 µL:n pipettejä. Peitä koeputki Parafilmillä käyttämällä Parafilmin sitä puolta, joka oli taustapaperia vasten. Kääntele koeputkea varovaisesti, jotta kaikki liukenee. Älä ravistele koeputkea.
- Lisää negatiivinen kontrolliaine ja glukaanivakiot. Kun seerumin esikäsitteleminen inkuboimalla (vaihe 3 d) on loppuillaan, poista levy lukulaitteesta. Lisää vakiot ja negatiivinen kontrolliaine levylle.
  - Lisää 25 µL reagenssivettä syvennyksiin G2 ja G3.
  - Lisää 25 µL 6,25 pg/mL:n vakoliousta 5 syvennyksiin F2 ja F3.
  - Lisää 25 µL 12,5 pg/mL:n vakoliousta 4 syvennyksiin E2 ja E3.
  - Lisää 25 µL 25 pg/mL:n vakoliousta 3 syvennyksiin D2 ja D3.
  - Lisää 25 µL 50 pg/mL:n vakoliousta 2 syvennyksiin C2 ja C3.
  - Lisää 25 µL 100 pg/mL:n vakoliousta 1 syvennyksiin B2 ja B3.
- Seuraavaksi lisäään Fungitell-reagenssi ja inkuboidaan levy.
  - Lisää 100 µL Fungitell-reagenssia kaikkiin syvennyksiin (negatiivsen kontrolliaineen, vakiodien ja näytteet sisältävien syvennyksiin) Stepper-pipeitin avulla.
  - Aseta levy lukulaitteeseen lämpötilaan 37 °C kannen ollessa kiinni. Ravistele 5-10 sekunnin ajan. Lue levy ilman kanssa aallonpituudella 405 nm vähennettynä 490 nm:llä 40 minuutin ajan lämpötilassa 37 °C. Jos taustan vähentäminen aallonpituudella 490 nm ei ole käytettävissä, levy voidaan lukea aallonpituudella 405 nm. Jos lukulaitteessa ei ole levynsekoitustoimintoa, voit käyttää erillistä sekoituslaitetta.
- Kerää tiedot ja analysoi ne seuraavasti. Lasje optisen tiheyden muutoksen keskiarvo kaikissa pisteissä 0 ja 40 minuutin välillä (milliabsorboitumisyksikköinä minuutissa).

### TULOSTEN TULKITSEMINEN

Fungitell-tutkimustulokset on tarkoitettu toimimaan apuna diagnosoitaessa invasiivisia sieni-infektioita. Tulokset ilmoitetaan pikogrammoina seerumimillilitraa kohden. Tulokset ovat alueella < 31 pg/mL (ei tunnistettavissa) ja > 500 pg/mL. Ohjelmisto tulostaa tiedot, tai ne voidaan lukea vakiokäyrästä. Tarkka yli 500 pg/ml:n tulos edellyttää, että näyte laimennetaan reagenssivedellä ja testataan uudelleen.

Laboratorion on ilmoittava tutkimuksen määränneelle lääkärille, että Fungitell ei tunnista tiettyjä sienilajeja, kuten *Cryptococcus* -sukua (16,17), jotka tuottavat erittäin vähän (1→3)-β-D-glukaania. Analyysi ei myöskään tunnista tiettyjä homesieniä, kuten *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus* (16, 17), sillä niiden ei tiedetä tuottavan (1→3)-β-D-glukaania. Myös *Blastomyces dermatitidiks*n hiivavaihe tuottaa vain vähän (1→3)-β-D-glukaania, joten sitä ei yleensä tunnisteta.

#### NEGATIIVINEN TULOS

(1→3)-β-D-glukaaniarvot alle 60 pg/ml tulkitaan negatiivisiksi tuloksiksi.

#### POSITIIVINEN TULOS

Arvot yli 80 pg/ml tulkitaan positiivisiksi. Positiivinen tulos ilmaisee, että (1→3)-β-D-glukaania on tunnistettu. Positiivinen tulos ei ole varma merkki sairaudesta. Diagnoosia tehtäessä on käytettävä muidenkin kliinisten löydösten tietoja.

#### EPÄSELVÄT TULOKSET

Jos arvo on alueella 60–79 pg/ml, syynä voi olla sieni-infektio. On suositeltavaa ottaa uudet seeruminäytteet ja testata ne. Näytteiden ottaminen ja testaaminen säännöllisesti helpottaa diagnosointia.

#### LAADUNVALVONTA

- Vakiokäyrän vastaavuuskerroin (r) (lineaarinen vs. lineaarinen) on > 0,980.
- 25 µL reagenssivettä sisältävät syvennykset ovat negatiivisia kontrolliliuoksia. Negatiivisten kontrollinesteiden todellisten optisten tiheyсарvojen (Vmean) on oltava alle 50 % vakioliuoksen alimmasta arvosta. Jos näin ei ole, analyysi on tehtävä uudelleen käyttämällä uusia reagensseja.
- Ongelmallisten näytteiden käsitteleminen: Jos laboranti huomaa värjäytyneitä, sameita, voimakkaasti hemolysoituneita, lipeemisiä tai runsaasti bilirubiinia sisältäviä näytteitä, näyte on laimennettava reagenssivedellä ja analysoitava uudelleen. Laimentaminen on otettava huomioon kertomalla analyysitulos laimennuskertoimella. Näytteen laimennuskerroin syötetään tavallisesti ohjelmistoon, jolloin korjaus tehdään automaattisesti.
- Jos tulos on erittäin pieni tai suuri, kontrollinäyttee voidaan analysoida sen varmistamiseksi, että reagenssit ja analyysi toimivat oikein. Analyysin tekijöiden on käytettävä laadunvarmistusohjelmaa analyysin toiminnan varmistamiseksi.

#### ANALYYSIN RAJOITUKSET

- Sieni-infektion sijainti kudoksessa (10), kapseloituminen ja tiettyjen sienten tuottaman (1→3)-β-D-glukaanin määrä voivat vaikuttaa analysoitavan aineen konsentraatioon seerumissa. Jos (1→3)-β-D-glukaania vapautuu verenkiertoon tavallista vähemmän, tiettyjä sieni-infektioita ei havaita. *Cryptococcus* spp. tuottaa (1→3)-β-D-glukaania vain vähän, sillä nämä sienet koteloituvat soluun. Homesienet, kuten *Absidia*, *Mucor* spp. ja *Rhizopus* spp. (16, 17), eivät tuota (1→3)-β-D-glukaania (16, 17). *Blastomyces dermatitidiks*n hiivavaihe tuottaa vain vähän (1→3)-β-D-glukaania, joten sitä ei yleensä tunnisteta (18).
- Joidenkin potilaiden (1→3)-β-D-glukaanitaso on koholla, joten tuloksesta tulee epäselvä. Tällöin on suositeltavaa uusia analyysi.
- Analyysin toistamistiheys määrätty sieni-infektion suhteellisen todennäköisyyden mukaan. Riskipotilaille tämä tutkimus on suositeltavaa tehdä vähintään 2–3 kertaa viikossa.
- Tietyillä verituteitoilla, kuten seerumin albumiinilla tai immunoglobuliineilla (19), hoidetuilta hemodialyysipotilailta (12, 13) tai glukaania sisältävälle harsolle altistuneilta potilailta on saatu positiivisia tuloksia. Seerumin (1→3)-β-D-glukaanimäärä palautuu normaaliksi 3–4 päivässä, jos potilas on altistunut kirurgiassa (1→3)-β-D-glukaania sisältäville sienille tai sideharsoille (6). Tämä aika on otettava huomioon myös otettaessa näytteitä kirurgiapotilailta.
- Kantapäästä tai sormesta otettuja näytteitä ei voi käyttää, sillä näytteen on havaittu kontaminoituvan valmisteltaessa näytteenottopaikkaa alkoholiin kostutetulla sideharsolla (ja mahdollisesti veren osussa ihoon).
- Tulokset on saatu aikuispotilailta. Lasten ja nuorten normaalitasot ovat lähellä aikuisten tasoja (21). Tietoja ei ole riittävästi neonataaleista eikä alle kuuden kuukauden ikäisistä potilaista.
- Analyysin tulokset ilmoitetaan alueella 31–500 pg/ml. 31 pg/ml alittavat arvot ilmoitetaan muodossa < 31 pg/ml. 500 pg/ml ylittävät arvot ilmoitetaan muodossa > 500 pg/mL.

#### TULOSSIIN HÄIRITSEVÄSTI VAIKUTTAVAT AINEET

Seuraavat näytteet voivat vaikuttaa Fungitell-analyysin tuloksiin:

- Hemolyyssi
- Lipemian aiheuttama näytteen sameus
- Silmin havaittava bilirubiini
- Samea seerumi

#### ODOTETUT ARVOT

Monet sieni-infektiot nostavat beetaglukaaniarvoja. Jos vähintään tasolla 80 pg/ml esiintyy niiden oireita tai merkkejä niistä, potilaalla on sieni-infektio 74,4–91,7 %:n todennäköisyydellä (taulukko 2). Jos tasolla alle 60 pg/ml ei esiinny sieni-infektion oireita tai merkkejä, potilaalla ei ole sitä 65,1–85,1 %:n todennäköisyydellä.

#### LUOTETTAVUUS

**Vertailu**

Monessa tutkimuskeskuksessa tehdyssä tutkimuksessa tarkasteltiin Fungitell-analyysin toimintaa. Sitä verrattiin muihin mykoosien ja fungemioiden tunnistusmenetelmiin, esimerkiksi verestä tehtyyn viljelmään, kudосnäytteen histopatologiseen tutkimuseen ja radiologisiin merkkeihin.

359 koehenkilöä testattiin. Kaikilta otettiin yksi näyte. Alhaisen riskin omaavat koehenkilöt olivat ilmeisen terveitä. Sairaaloissa otettavat näytteet otettiin potilailta, jotka olivat tulleet hoitoon muun syyn kuin sieni-infektion vuoksi. Tulokset tutkittiin kuudella klinikalla Yhdysvalloissa. Niistä neljästä tehtiin analyysit. Yhteensä 285 näytettä tutkittiin. ACC tutki kaikki 359 näytettä kahdesti, mutta analyysin luotettavuutta arvioitiin vain jälkimmäisten tulosten avulla. Jälkimmäiset analyysitulokset eivät eroanneet ensimmäisistä tilastollisesti.

Kaikkien koehenkilöiden (359) tutkimustulosten luotettavuus *Cryptococcus* mukaan lukien oli 65,0 % (luotettavuusväli 60,1–70,0 %). Spesifisyys oli 81,1 % (luotettavuusväli 77,1–85,2 %) (taulukko 1). Neljästä testauspaikasta saatujen tulosten luotettavuusalue oli 50,0–66,7 %. 285 tutkitun näytteen spesifisyys oli 70,0–93,0 % (taulukko 2).

<b>Taulukko 1 ACC-tulokset tasolla 60–80<span> </span>pg/ml, tutkimuspaikkakohtainen katkaisutaso</b>								
Paikka	Varma/todennäköinen Herkkyys ≥>= 80 <span> </span> pg/ml		Spesifisyys < 60 <span> </span> pg/ml				Epäselvä 60 <<= X <<80	Yhteensä
	Sijainti / kliinikan sijainti	Herkkyys	Positiivinen emustearvo	Negatiivinen / kliinisesti negatiivinen	Spesifisyys	Negatiivinen emustearvo		
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 käytävissä	0/0	Ei käytävissä	0.0	0	1
Yhteensä <sup>1</sup>	106/163	65.0	80.9	159/196	81.1	76.8	21	359

**\*Sisältää yhden näytteen paikasta 6.**

Kun ACC:n saamia tuloksia (359 näytettä) ja kliinisesti saatuja tuloksia (285 näytettä) verrataan kliiniseen diagnoosiin, ACC:n herkkyys on 64,3 % (luottamusväli 58,8–69,9 %) ja muiden paikkojen 61,5 % (luottamusväli 55,9–67,2 %). ACC:n spesifisyys on 86,6 % (luottamusväli 82,7–90,6 %) ja muiden paikkojen 79,6 % (luottamusväli 74,9–84,3 %) (taulukko 2).

<b>Taulukko 2 Testauspaikkojen tulokset tasolla 60–80<span> </span>pg/ml, tutkimuspaikkakohtainen katkaisutaso</b>								
Paikka	Varma/todennäköinen Herkkyys ≥>= 80 <span> </span> pg/ml		Spesifisyys < 60 <span> </span> pg/ml				Epäselvä 60 <<= X <<80	Yhteensä
	Sijainti / kliinikan sijainti	Herkkyys	Positiivinen emustearvo	Negatiivinen / kliinisesti negatiivinen	Spesifisyys	Negatiivinen emustearvo		
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 *								
Paikat yhteensä	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 testauspaikka**

#### KANDIDAASI

Koehenkilöistä 107:llä diagnosoitiin kandidaasi. Fungitell-analyysi tuotti positiivisen tuloksen 83:llä heistä.

Associates of Cape Cod sai 175 arkistoitua kandidaasinäytettä. Analyysi tuotti positiivisen tuloksen 145:lle niistä.

#### ASPERGILLOOSI

10 koehenkilöllä oli aspergilloosi. Analyysi tuotti positiivisen tuloksen 8:lle heistä.

#### FUSARIOOSI

Kolmella koehenkilöllä oli fusarioosi. Analyysi tuotti positiivisen tuloksen 2:lle heistä.

#### HOITO SIENILÄÄKKEILLÄ

Sienilääkehoidon käyttämisellä tai puuttumisella ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta analyysin herkkyyteen. 118 koehenkilöllä oli invasiivinen sieni-infektio, ja he saivat siihen lääkitystä. Analyysitulos on positiivinen 82:lla heistä (herkkyys 69,5 %; luottamusväli 61,2–77,8 %). Lisäksi 24 koehenkilön tulos oli positiivinen, mutta he eivät saaneet siihen lääkitystä. Analyysitulos on positiivinen 18:lla (herkkyys 75 %; luottamusväli 57,7–92,3 %).

#### SPESIIFISYYS

Yhteensä 170 koehenkilön sieni-infektiotulos oli negatiivinen. He olivat perusterveitä. Spesifisyys oli 86,5 % (luotettavuusväli 82,8–90,1 %). Vielä 26 henkilöön sieni-infektiotulos oli negatiivinen, mutta heillä oli muita sairauksia. Spesifisyys oli siksi 81,1 % (luottamusväli 77,1–85,2 %).

#### TESTIKORRELAATIOT

Neljällä klinikalla analysoitiin yhteensä 285 näytettä. Näiden tulosten korrelaatio oli 96,4 % verrattaessa niitä Associates of Cape Codin saamiin tuloksiin. Associates of Cape Codin korrelaatio yksittäisten tutkimuspaikkojen kanssa oli alueella 90,6–99,2 %.

#### TARKKUUS

Tarkkuustutkimuksissa 10 erilaista näytettä tutkittiin kolmessa paikassa kolmena eri päivänä. Vaihteluväli oli alueella 0,9–28,9 %. Analyysin sisäinen vaihteluväli oli alueella 3,9–23,8 %. Neljä negatiivista näytettä jätettiin pois molemmista analyyseistä.










- 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., Kantarjijan, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2004) -Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199-205.
- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2005) A prospective pilot survey of B-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 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.



#### MUUT VIITTEET, JOITA EI OLE KÄYTETTY

- 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.

### SYMBOLIEN SELITTEET

	<b>"Käytettävä viimeistään"</b>
	<b>"Sisältää riittävästi N testitä varten"</b>
	<b>"Erän koodi"</b>
	<b>"Lääketieteellinen laite In vitro -diagnoseja varten"</b>
	<b>"Luettelonro"</b>
	<b>"Lämpötilarajoitus"</b>
	<b>"Valmistaja"</b>
	<b>"Lue käyttöohjeet ennen käyttämistä"</b>
	<b>"Valtuutettu edustaja"</b>

**"CE-merkintä"**

		<b>Associates of Cape Cod® International, Inc.</b>
		Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, UK