

(1→3)-β-D-Glukaanin analyysi seerumista

FUNGITELL®	
Käyttöohjeet	
<p>ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED</p> <p>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</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>
<p>PN001268-f, rev. 1</p>	<p>Tarkistettu versio, helmikuu 2011</p>

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 (1) keskeinen solun seinämien rakenneosa. Sen auttaa tunnistamaan kudostensäisät mykoosit ja fungemiat (2). Positiivinen tulos ei ilmaise, mikä sieni aiheuttaa infektion.

Fungitell-analyysia tulee käyttää yhdessä muiden diagnoosimenetelmien, kuten mikrobiologisen viljelyn, biopsianäytteiden histologisen tutkimisen ja radiologisen tutkimusten, kanssa.

On tärkeää antaa nämä tiedot hoitavalle lääkärille:
<p>Fungitell-analyysi ei tunnista tiettyjä sienilajeja, esimerkiksi <i>Cryptococcus</i>-sukuun kuuluvia, sillä ne tuottavat (1→3)-β-D-Glukaania (3, 4) erittäin vähän. Analyysi ei myöskään tunnista tiettyjä homesieniä, kuten <i>Absidiaa</i>, <i>Mucoria</i> ja <i>Rhizopusia</i> (1, 4), 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 (5).</p>
Ilmoita nämä tiedot raportoidessasi glukaanianalyysin tulokset.

YHTEENVETO JA SELVITYS

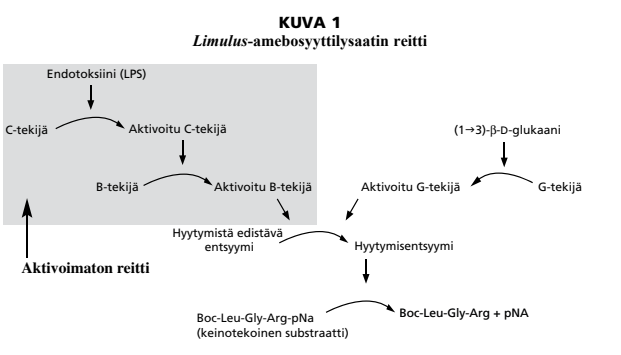
Ensisijaisista ja oportunistisista patogeeneista yhä useammat ovat sieni-infektioita, varsinkin potilailla (6, 7, 8), joiden immuunipuolustusjärjestelmän toiminta on heikentynyt. Invasiiviset sienitaudit ovat yleisiä oportunistisina infektioina vakavista hematologisista sairauksista kärsivien ja AIDS-potilaiden keskuudessa. Ne aiheuttavat yhä enemmän nosokomiaalisia infektioita varsinkin elinsiirtojen saajilla ja muilla potilailla, jotka saavat immuunipuolustusjärjestelmän toimintaa heikentävää lääkitystä (9, 10). Monet sienitaudit saavat alkunsa hengitettäessä sieni-itöitä, jotka ovat lähtöisin maaperästä, kasvijätteista, ilmakehäsittelyjärjestelmistä ja/tai altistuneista pinnoista. Tiettyjä oportunistisia sieniä esiintyy ihmisen iholla, ruoansulatuskanavassa ja limakalvoilla (11, 12). Invasiivisten mykoosien ja fungemioiden diagnoosi perustuu tavallisesti epäspesifiseen diagnoosiin tai radiologisiin tekniikoihin. Viime aikoina sieni-infektioiden biomarkkereita on lisätty käytettävissä oleviin diagnostisiin menetelmiin (2).

Oportunistisiin patogeeneihin kuuluvat *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* ja *Pneumocystis jirovecii*. Fungitell-analyysillä (1, 8, 13) voidaan tunnistaa näiden ja muiden organismien tuottama (1→3)-β-D-Glukaani.

TOIMINTAPERIAATE

Fungitell-analyysi mittaa (1→3)-β-D-Glukaanin määrää. Analyysi perustuu muokatun *Limulus*-amebosyyttilysaatin (LAL) reittiin (14, 15, 16, 17), 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 hyytymistä edistävän entsyymin aktiiviseksi hyytymisentsyymiksi, joka puolestaan pilkkoo kromogeenisen peptisen aineen Boc-Leu-Gly-Arg-pNA:n pNA:ta. Näin syntynvä kromofori imeytyy aallonpituudella 405 nm. Jäljempänä kuvattava kineettinen Fungitell-analyysi perustuu näytteen optisen tiheyden muuttumiseen. Tätä arvoa tulkitaan vakioikäyrää 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 spesifää LAL-lysaattia (kaksi koeputkea)
- Pyrosol®-puskuriainetta, Tris hankkia 0,2 M pH 7,4 (kaksi pulloa). Pyrosol-puskuriainetta (tuotenumero BC051) voi hankkiä lisää erikseen.
- Glukaanivakiota, pakastekuivattua kovakalvoa ja reagoimatonta täyteainetta, (1→3)-β-D-Glukaanisisältö näkyy kahden koeputken etiketeissä
- Reagenssivettä (RGW) (kaksi pulloa)
- Tulenkestävät levyt: Tasainen pohja, 96 syvennystä, päällystämättömät kannelliset mikrolevyt, ei interferoivia glukaaneita (kaksi)
- KCI 1.2 M (yksi koeputki)
- KOH 0.25 M (yksi koeputki)

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

TARVITTAVAT MUUT MATERIAALIT

Missään materiaalissa ei saa olla glukaania. Lasiesineitä on kuumentettava kuivana 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* vakiosarjavalmistelu ja seerumihoitoreagenssin yhdistämistä varten. (13 x 100 mm:n boorisilikaattilasi - Cat# TB013)
- Inkubointilevyn (37 °C) lukulaite, joka pystyy tarkkailemaan kahta aallonpituutta: 405 ja 490 nm. Dynaamisen alueella on oltava vähintään 2,0 absorbointiyksikköä yhdistettynä sopivaan tietokonepohjaiseen kineettiseen analysointiohjelmaan.
- Sterileijä glukaanittomia kierrekorkeilla varustettuja näytteiden säilytysputkia (useimmissa pyrogeenittömässä 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 VAROITIMET

Tämä tuote on tarkoitettu DIAGNOSTISEEN IN VITRO -KÄYTTÖÖN.

Fungitell-analyysi asettaa tiukat vaatimukset tekniikalle ja testausympäristölle. Analyysin onnistuminen edellyttää, että laborantit koulutetaan hallitsemaan analyysimenetelmää ja estämään kontaminaatio.

- Lajit, joita Fungitell-analyysi ei tunnista: Niitä ovat *Cryptococcus*-suku (3, 4) ja tsgyomgeetit, kuten *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus* (1, 4). Myös *Blastomyces dermatitidksen* hiivavaihe tuottaa vain vähän (1→3)-β-D-Glukaania, joten Fungitell-analyysi ei yleensä tunnista sitä (5).
- 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 käsineitä käsitellessäsi potilasnäyteitä.

- Hemodialyysipotilaiden seerumissa voi olla suuria määriä (1→3)-β-D-Glukaania käytettäessä tiettyjä selluloosapohjaisia dialyysikalvoja (18, 19). 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-analyysieissä on saatu positiivisia tuloksia kontaminaation vuoksi (20, 21).
- Sarjaa ei saa käyttää, jos sen sisältö on vaurioitunut.
- Mahdollisesti kontaminoituneille (patogeenejä sisältäville) nesteille altistuneet materiaalit on hävitettävä paikallisten määräysten mukaisesti.

Reagenssin 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 hyytyä. Seerumi erotellaan hyytyneststä massasta ja dekantoidaan tarkoitukseen soveltuvaan astiaan, jossa ei ole (1→3)-β-D-Glukaania.
- Näytteiden säilyttäminen: Seeruminäytteitä voidaan säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa ennen analysointia tai jäädytettynä -20 °C:n lämpötilassa tai kylmemmässä. Testit tulee suorittaa pian näytteiden laadun heikkenemisen välttämiseksi.
- Näytteiden merkitseminen: Näytteet on merkittävä selkeästi vallitsevan käytännön mukaisesti.

TOIMINTA

Huomautus: Toimenpiteet voivat vaihdella käytettävien laitteiden ja ohjelmiston mukaan. Yleensä toimitaan seuraavasti. Määritä Platerreader-ohjelmisto keräämään tietoja V^{mean}-tilassa. Tarkista oikeat asetukset ohjelmiston käyttöohjeesta sen varmistamiseksi, että laskettava arvo on kaikkien tietopisteiden optisen tiheyden muutoksen keskiarvo. Aseta instrumentin ”lukemisväli” ohjelmiston sallimaan minimiarvoon ja instrumentti yli 40 minuutin testausjaksoon. Ohjelmiston aallonpituusasetukseksi on valittava 405 nm vähennettynä taustan 490 nm:llä. Jos kahta aallonpituutta ei voi valita, valitse 405 nm. Inkubointilämpötilan tulee olla 37 °C. Levyä on ravisteltava 5–10 sekunnin ajan ennen lukemisen aloittamista. Käytän sovitusasetuksen tulee olla lineaarinen/lineaarinen tai vastaava. Lukeminen on aloitettava viivytyksettä.

- Valmistele sarjan mukana toimitettu glukaanivakio.
 - Liuota yksi koeputkellinen glukaanivakiota 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–e jäljempänä kuvataan käyränvalmisteluvaihe.
 - Valmistaa 50 pg/ml:n vakoliuosta sekoittamalla 500 µl reagenssivettä ja 500 µl liuosta 1 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 2. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
 - Valmistaa 25 pg/ml:n vakoliuosta sekoittamalla 500 µl reagenssivettä ja 500 µl liuosta 2 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 3. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
 - Valmistaa 12,5 pg/ml:n vakoliuosta sekoittamalla 500 µl reagenssivettä ja 500 µl liuosta 3 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 4. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
 - Valmistaa 6,25 pg/ml:n vakoliuosta sekoittamalla 500 µl reagenssivettä ja 500 µl liuosta 4 glukaanittomassa koeputkessa. Näin syntyy liuos 5. Heiluta pyöremäisesti vähintään 10 sekuntia.
- Valmistaa seerumin esikäsitteilyreagenssi. Alkalinen seerumin esikäsitteilyreagensi muuntaa kolmekiteiset glukaanit yksijakoisiksi glukaaneksi (16, 17), jotka reagoivat analyysissa helpommin. Korkea pH myös passiivio seerumin seriniiniproteaasit ja serimiiniproteaasien estäjä. Edellä mainitut voivat aiheuttaa virheellisen positiivisen ja jälkimmäiset virheellisen negatiivisen tuloksen (22).
 - Valmistaa seerumin esikäsitteilyreagenssi yhdistämällä yhtä suuret määrät 0,25 M KOH:ia ja 1,2 M KCl:ää. Sekoita hyvin. Reagenssin 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 vakioikäyrää 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. Mikroitrauslevyssä 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 tiivistyneen höyryn aiheuttaman optisen häiriön välttämiseksi.

- Lisää seerumi ja sen esikäsitteilyreagenssi.
 - Sulata pakastetut seeruminäytteet huoneenlämpöiseksi. Sekoita kaikki näytteet hyvin.
 - Siirrä 5 µl seeruminäytettä niille tarkoitettuihin syvennyksiin (Uk) ainakin kaksinkertaisena määränä. Toista toiset kaikille seeruminäytteille.
 - Lisää 20 µl seerumin esikäsitteilyreagenssia 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 esikäsitteilyn inkuboinnin ollessa meneillään.
 - Valmistaa koeputkellinen Fungitell-reagenssia lisäämällä 2,8 ml reagenssivettä ja lisäämällä 2,8 ml Pyrosol-puskuriainetta. 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 loppualla, 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 vakoliuosta 5 syvennyksiin F2 ja F3.
 - Lisää 25 µl 12,5 pg/ml:n vakoliuosta 4 syvennyksiin E2 ja E3.
 - Lisää 25 µl 25 pg/ml:n vakoliuosta 3 syvennyksiin D2 ja D3.
 - Lisää 25 µl 50 pg/ml:n vakoliuosta 2 syvennyksiin C2 ja C3.
 - Lisää 25 µl 100 pg/ml:n vakoliuosta 1 syvennyksiin B2 ja B3.
- Seuraavaksi lisätään Fungitell-reagenssi ja inkuboidaan levy.
 - Lisää 100 µl Fungitell-reagenssia kaikkiin syvennyksiin (negatiivisen kontrolliaineen, vakioiden ja näytteet sisältäviin syvennyksiin) Stepper-pipetin avulla.
 - Aseta levy lukulaitteeseen lämpötilaan 37 °C kahden 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: Tutki näytteiden optinen tiheys ja etsi muita kineettisiä jälkiä kuin hienoista lisääntymistä, joka on verrattavissa normaalin lisääntymiseen. Mitäitö kohdat, jotka osoittavat optisia häiriöitä. Laske optisen tiheyden muutoksen keskiarvo kaikissa pisteissä 0:n ja 40 minuutin välillä (milliabsorboitumisyksikköinä minuutissa).

TULOSTEN TULKITSEMINEN

Fungitell-tutkimustulokset on tarkoitettu toimimaan apuna diagnoositaessa 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 vakioikäyrästä. Tarkka yli 500 pg/ml:n tulos edellyttää, että näyte laimennetaan reagenssivedellä ja testataan uudelleen.

Testin suorittavan laboratorion on ilmoitettava tutkimuksen määränneelle lääkärille, että Fungitell ei tunnista tiettyjä sienilajeja, kuten *Cryptococcus*-sukua (3, 4), jotka tuottavat erittäin vähän (1→3)-β-D-Glukaania. Analyysi ei myöskään tunnista tiettyjä homesieniä, kuten *Absidiaa*, *Mucoria* ja *Rhizopusia* (1, 4), sillä niiden ei tiedetä tuottavan (1→3)-β-D-Glukaania. Myös *Blastomyces dermatitidksen* hiivavaihe tuottaa vain vähän (1→3)-β-D-Glukaania, joten sitä ei yleensä tunnista (5).

NEGATIIVINEN TULOS

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

POSITIIVINEN TULOS

Yli ≥80 pg/ml:n arvot 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 reagensivettä sisältävät syvennykset ovat negatiivisia kontrolliliukuksia. 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 laborantti huomaa epätavallista optisen tiheyden kinetiikkaa näytteessä, joka on samaa, värjäätynyt tai paksu (kuten näyte, joka on voimakkaasti hemolysoitunut, lipeeminen tai runsaasti bilirubiinia sisältävä), näyte on laimennettava reagenssivellä ja analysoitava uudelleen. Laimentaminen on otettava huomioon kertomalla analyysitullos laimennuskertoimella. Näytteen laimennuskerroin syötetään tavallisesti ohjelmistoon, jolloin korjaus tehdään automaattisesti.
- Jos tulos on erittäin pieni tai suuri, kontrollinäytteet voidaان analysoida sen varmistamiseksi, että reagenssit ja analyysi toimivat oikein. Analyysin tekijöiden on käytettävä laadunvarmistusohjelmaa analyysin toiminnan varmistamiseksi.

ANALYYSIN RAJOITUKSET

- Sieni-infektion sijaanti kudoksessa (10), kapseloituminen ja tiettyjen sienten tuottaman (1→3)-β-D-Glukaanin määrä voivat vaikuttaa analyysitavien aineen konsentraation analyytissä. Jos (1→3)-β-D-Glukaania vapautuu verenkiertoon tavallista vähemmän, tiettyjä sieni-infektioita ei ehkä havaita. *Cryptococcus spp.* tuottaa (1→3)-β-D-Glukaania (3, 4) vain vähän. Homesienten, kuten *Asbidia spp.*n, *Mucor spp.*n ja *Rhizopus spp.*n ei tiedetä tuottavan (1→3)-β-D-Glukaania (1, 4). *Blastomyces dermatitidikesen* hiivavaihe tuottaa vain vähän (1→3)-β-D-Glukaania, joten testitulokset ovat yleensä negatiivisia (5).
- Joidenkin potilaiden (1→3)-β-D-Glukaanitaso on koholla, joten tuloksesta tulee epäselvä. Tällöin on suositeltavaa uusia analyysi.
- Analyysin toistamistheys määräytyy sieni-infektion suhteellisen todennäköisyyden mukaan. Riskipotilaille tämä tutkimus on suositeltavaa tehdä vähintään 2–3 kertaa viikossa.
- Positiivisia tuloksia on saatu hemodialyysipotilailla (18, 19), henkilöillä, joita on hoidettu tietyillä verituotteilla, kuten seerumin albumiinilla tai immunoglobuliineilla (23), ja glukaaania sisältävälle harsolle altistuneilla näytteillä tai potilailla. Potilaiden seerumin (1→3)-β-D-Glukaanimäärä palautuu normaalkisi 3–4 päivässä, jos potilas on altistunut kirurgiassa (1→3)-β-D-Glukaania sisältäville sienille tai sideharsoille (20, 21). Tämä aika on otettava huomioon myös ottaessa näytteitä kirurgiapotilailta.
- Kantapäästä tai sormesta otettuja näytteitä ei voi käyttää, sillä näytteen on havaittu kontaminoituvan valmisteltaessa näytteenottopaikkaa alkoholiin kostutetulla sideharsolla (ja mahdollisesti veren osuessa ihoon).
- Tulokset on saatu aikuispotilailta. Lasten ja nuorten normaalitasot ovat lähellä aikuisten tasoja (24). Tietoja ei ole riittävästi vastasyntyneistä eikä alle kuuden kuukauden ikäisistä pikkulapsista.
- Analyysin tulokset ilmoitetaan alueella 31–500 pg/ml. 31 pg/ml:n alittavat arvot ilmoitetaan muodossa < 31 pg/ml. 500 pg/ml:n ylittävät arvot ilmoitetaan muodossa > 500 pg/ml, ellei näytettä ole laimennettu.

TULOSSIIN HÄIRITSEVÄSTI VAIKUTTAVAT AINEET

Seuraavat näytteet voivat vaikuttaa Fungitiell-analyysin tuloksiin:

- hemolyysi
- lipemian aiheuttama näytteen sameus
- silmin havaittava bilirubiini
- samaa 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 Fungitiell-analyysin toimintaa (25). Sitä verrattiin muihin mykoosien ja fungemioiden tunnistusmenetelmiin, esimerkiksi verestä tehtyyn viljelmään, kudonsäilytteen histopatologiseen tutkimukseen ja radiologisiin merkkeihin.

359 koehenkilöä testattiin. Kaikilta otettiin yksi näyte. Alhaisen riskin omaavat koehenkilöt olivat ilmeisen terveitä. Sairaalossa otettavat näytteet otettiin potilailta, jotka olivat tulleet hoitoon muun syyn kuin sieni-infektion vuoksi. Tulokset tulkittiin 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 tulokset eivät eronneet ensimmäistä 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).

Taulukko 1	ACC-tulokset tasolla 60–80 pg/ml, tutkimuspaikkakohtainen katkaisutaso							
Paikka	Varma/todennäköinen Herkkyys ≥ 80 pg/ml		Spesifisyys < 60 pg/ml				Epäselvä 60 ≤ X < 80	Yhteensä
	Sijaanti / kliinikan sijaanti	Herkkyys	Positiivinen ennustearvo	Negatiivinen / kliinisesti negatiivinen	Spesifisyys	Negatiivinen ennustearvo		
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 käytettävissä	0/0	Ei käytettävissä	0,0	0	1
Yhteensä*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

*Sisältää yhden näytteen paikasta 80.

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).

Taulukko 2	Testauspaikkojen tulokset tasolla 60–80 pg/ml, tutkimuspaikkakohtainen katkaisutaso							
Paikka	Varma/todennäköinen Herkkyys ≥ 80 pg/ml		Spesifisyys < 60 pg/ml				Epäselvä 60 ≤ X < 80	Yhteensä
	Sijaanti / kliinikan sijaanti	Herkkyys	Positiivinen ennustearvo	Negatiivinen / kliinisesti negatiivinen	Spesifisyys	Negatiivinen ennustearvo		
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. Fungitiell-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. Analyysitullos 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. Analyysitullos on positiivinen 18:lla (herkkyys 75 %; luottamusväli 57,7–92,3 %).

SPEsIFISYYS

Yhteensä 170 koehenkilön sieni-infektiotulos oli negatiivinen. He olivat perusterveitä. Spesifisyys oli 86,5 % (luotettavuusväli 82,8–90,1 %). Vielä 26 henkilön 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.

VIITEET











- 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.
- 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-Glucan 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-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.
- 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 Kawat, T. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan 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-Flori, 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.
- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2004. β-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.
- 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-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* 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-Glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.
- Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mmura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan 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-Glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
- Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Arnetu, K., Endo, S., Aoyagi, T., Iden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kumishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan 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-glucan (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-Glucan 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-Glucan 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-Glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-glucan 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-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin. Inf. Dis. 41: 299-305.


MUUT VIITEET, JOITA EI OLE KÄYTETTY

a) 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-Glucan as a diagnostic tool for *Pneumocystis jiroveci* 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-Glucan 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-Glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. J. Med. Microbiol. 57: 287-95.
- Marty, F.M., Lowry, C.M., Lempietski, S.J., Kubiak, D.W., Finkelman, M.A., and Baden, L. R., 2006. Reactivity of (1→3)-β-D-Glucan 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-Glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jiroveci* 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-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, M., 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, R., 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., Tsumoda, 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

	”Käytettävä viimeistään”
	”Sisältää riittävästi N testitä varten”
	”Erän koodi”
	”Lääketieteellinen laite <i>In vitro</i> -diagnoseja varten”
	”Luettelonro”
	”Lämpötilarajoitus”
	”Valmistaja”
	”Luc käyttöohjeet ennen käyttämistä”
	”Valtuutettu edustaja”
	”CE-merkintä”

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