

Seerumi (1→3)-beeta-D-glükaani sisalduse analüüs

ANALÜÜS FUNGITELL®

Kasutusjuhend



124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02556 USA


Telefon (508) 540-3444
 Tasuta tel. (888) 395-2221
 Faks (508) 540-8680
 Tehniline tugi (800) 848-3248
 Klienditeenindus (800) 525-8378

ISO 9001



2021-12-14

PN001268-ef RevT1
REF FT001
2021-12-14

 Kasutusjuhendi teie keeles leiate aadressilt www.acciusa.com.

See toode on ette nähtud ainult in vitro diagnostiliseks ja professionaalseks kasutamiseks.

1. Kasutusstarve

Analüüs **Fungitell®** on proteaasi sümogeenil põhinev kolorimeetriline analüüs (1→3)-beeta-D-glükaani kvalitatiivseks määramiseks seerumis patsientidel, kellel on invasiivse seeninfektsiooni sümptomid või selle eelsoodumust põhjustav tervislik seisund. Mitmete meditsiiniliselt oluliste seente rakuseina tähtsa komponendi (1→3)-beeta-D-glükaani seerumikonsentratsiooni¹, võib kasutada abiks süvamükosiidide ja fungeemiate diagnoosimisel². Selle positiivne tulemus ei näita, milline seente perekond võib infektsiooni põhjustada.

(1→3)-beeta-D-glükaani tiitreid peab kasutama koos teiste diagnostiliste meetodite, näiteks mikrobioloogilise külvi, biopsiaproovi histoloogilise uuringu ja radioloogilise uuringuga.

Tähtis
<p>Esitage tellivale arstile järgmine teave. <i>Mõningad seened, näiteks kriptokokkide perekonnast, mis toodavad (1→3)-beeta-D-glükaani väga madalal tasemel, ei pruugi öista seerumi (1→3)-beeta-D-glükaani sisaldust piisavalt, et seda saaks analüüsiga avastada</i>^{3,4}. Infektsioonid selti <i>Mucorales</i> (nühallikulaadsed) kuulvate seenetega, nagu <i>Abidia</i>, <i>Mucor</i> ja <i>Rhizopus</i>^{5,6}, mis teadaolevalt (1→3)-beeta-D-glükaani ei tooda, annavad ka madalaid seerumi (1→3)-beeta-D-glükaani tiitreid. Peale selle produseerib <i>Blastomyces dermatitidis</i> oma pärmifaasis vähe (1→3)-beeta-D-glükaani ja analüüs ei pruugi seda tuvastada⁷.</p> <p>Lisage see märkus Fungitell®-i analüüsi tulemustest teatamisel.</p>

2. Kokkuvõtte ja selgitus

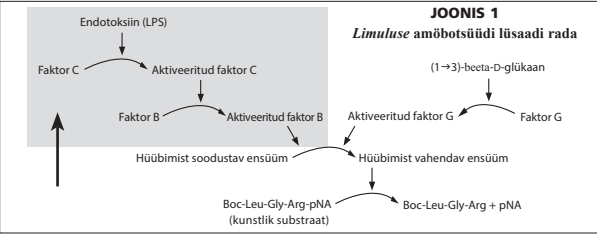
Opportunistlike patogeenide põhjustatud seeninfektsioonide esinemissagedus suureneb, eriti immuunpuudulikkusega patsientidel^{8,9}. Invasiivseid seeninfektsioone kui oportunistlikke infektsioone esineb sageli pahaloomuliste hematoloogiliste kasvajate ja AIDSiga patsientidel ning need moodustavad üha suurema osa haiglas saadud infektsioonidest, eriti elundi siirdamisega patsientidel ja teistel immuunsuppressantravi saavatel patsientidel¹⁰. Paljusid seenhaigusi saadakse pinnasest, taimede jääkidelt, õhukäitlussüsteemidelt ja/või lahtistelt pindadelt pärinevate seeneeoste sissehingamisel. Mõningaid oportunistlikke seeni esineb inimese nahal või nahas, seedetraktis ja limaskestadel^{11,2}. Invasiivsete mükosiidide ja fungeemiate diagnoos põhineb tavaliselt mitmetpetsifilistel diagnostilistel või radioloogilistel meetoditel. Hiljuti on olemasolevatele diagnoosimeetoditele lisandunud ka seeninfektsiooni kindlaksmääramine biomarkerite abil³.

Oportunistlike seenpatogeenide hulka kuuluvad *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* ja *Pneumocystis jirovecii*. Analüüsiga Fungitell® on võimalik tuvastada neis ja teistes organismides toetud (1→3)-beeta-D-glükaani^{1,8,13,14}.

3. Protseduuri põhimõte

Analüüsiga Fungitell® mõõdetakse (1→3)-beeta-D-glükaani. Analüüs põhineb *Limuluse* amöbotsüüdi lüsaadi (LAL) raja modifikatsioonil

Joonis 1. Analüüsi Fungitell® reagent on modifitseeritud eemaldama bakterite endotoksiini reaktiivsust ja seega reageerima faktori G vahendatud kõrvalraja kaudu vaid (1→3)-beeta-D-glükaaniga. (1→3)-beeta-D-glükaan aktiveerib faktori G, mis on serinproteaasi sümogeen. Aktiveeritud faktor G muundab inaktiivse hüübimist soodustava ensüümi aktiivseks hüübimist vahendavaks ensüümiks, mis omakorda eelaldab kromogeense peptiidsubstraadi Boc-Leu-Gly-Arg-pNA küljest pNA fragmendi. lues kromofoori paranitroaniiliini, milles neeldub valgus lainepikkusega 405 nm. Allpool kirjeldatud kineetiline analüüs Fungitell® põhineb proovis tekitatud optilise tiheduse suurenemise kiiruse määramisel. Seda kiirust tõlgendatakse vastavalt standardkõverale, mille tulemusena saadakse hinnanguline (1→3)-beeta-D-glükaani konsentratsioon proovis.



4. Fungitell®-i kompleksis sisalduvad materjalid

Fungitell®-i komplekt on mõeldud in vitro diagnostiliseks kasutamiseks. Ühes kompleksis olevaid järgmisi materjale jätkub 110 lohu analüüsimiseks kahel mikrotüiterplaadil (55 lohu kummalmgi plaadil).

- Analüüsi Fungitell®-i reagent, lüofiliseeritud (1→3)-beeta-D-glükaani suhtes spetsiifiline LAL (kaks viala). *Analüüsi Fungitell® reagent koosneb Limuluse (st odasaba) amöbotsüüdi lüsaadist ja Boc-Leu-Gly-Arg-pNA kolorimeetrilisel substraadist. See ei sisalda inimese ega imetaja valke.*
- Pyrosol® – lahustamispuhver (kaks viala). Lahustamispuhvri Pyrosol (katalooginumber BC051) vialale saab eraldi juurde osta. *See koosneb 0,2 M Tris puhvrist.*
- Glükaani standard, lüofiliseeritud (1→3)-beeta-D-glükaan ettevõttel Pachyman (kaks viala). *Lisatava reagentivee kogus on näidatud vialali etiketil. See on kalibreeritud sisemise võrdlusstandardi järgi.*
- LAL reagentivesi (LRW) (kaks pudelit)
- Märkus.** 20 mL reagenti kvaliteediga vesi (RGW) ja klaasvialas LRW on samaväärsed.
- Leeliseline eeltöötluslahus (kaks viala), mis sisaldab *0,125 M KOH-i ja 0,6 M KCl-d*

Mitte ükski neist peale standardi, ei sisalda häirivalt hulgal (1→3)-beeta-D-glükaani.

5. Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad materjalid

Kõik materjalid peavad olema vabad häirivast glükaanist.

- Pipetiotsikud* (250 µL – kataloogi nr PPT25, 1000 µL – kat.nr PPT10)
- Pipetid, millega saab mõõta 5–25 µL ja 100–1000 µL maht
- Reguleeritav automaatpipett koos süstlaotsikutega, millega saab mõõta 100 µL mahtu
- Katsutid* standardiseeria (kalibreerimiskõvera) valmistamiseks ja seerumi töötusreagentidega segamiseks. (12 x 75 mm – kat.nr TB240 või 13 x 100 mm – kat.nr TB013)
- Sobiva arvutipõhise kineetilise analüüsi tarkvaraga ühendatud inkubatsiooni (37 °C) plaatlugeja, mis suudab jälgida lainepikkust 405 nm (eelistatavalt kahte, 405 ja 490 nm, lainepikkust) ning mille dünaamiline vahemik on vähemalt kuni 2,0 neeldumisühikut.
- Sterilised, glükaanivabad katsutid proovide alikvootimiseks. Kasutada võib katsuteid, mis on sertifitseeritud RNAaasi-, DNAaasi- ja pürogeenivabad.
- Parafilm®
- 96 lohuga mikroplaadid* **Märkus.** Analüüsi Fungitell® nõuded on valideeritud järgmistest oadustega plaatidega: polüstüreenist, sterilised, kattekihita, lameda põhjaga, ei sisalda häirivates kogustes beetaglükaani ACC tehniliste tingimuste kohaselt ja ükshaaval ümbristes.

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

6. Reagentide säilitamine

- Hoidke kõiki reagente tarmitud kujul temperatuuril 2–8 °C pimedas.
- Lahustatud Fungitell®-i reagenti tuleb hoida temperatuuril 2–8 °C ja kasutada 2 tunni jooksul. Alternatiivselt võib lahustatud Fungitell®-i reagenti kuni 20 päeva hoida külmutatuna temperatuuril –20 °C, sulatada vaid ühe korra ja kasutada.

7. Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- Ärge pipeteerige ühtegi materjali suuga. Ärge suitsetage, sööge ega jooge proovide või komplekti reagentide käitlemise piirkondades.
- Järgige töö- ja kohalikke ohutuseeskirju.
- Nakkusohltike või ohtlike bioloogiliste proovide käsitlemisel kandke kaitsekindaid. Kinnastega käsi tuleks kogu aeg pidada saastunuks; hoidke oma kinnastega käed silmadest, suust ja ninast eemal. Aerosooliga saastumise võimalusel kandke silmakaitset ja kirurgilist maski.
- Märkus.** Ärge kasutage kahjustatud sisuga komplekte.
- Kõrvaldamine. Kemikaalide ja preparaatide jääke peetakse üldiselt ohtlikeks jäätmeteks. Seda tüüpi jäätmete kõrvaldamine on reguleeritud riiklike ja piirkondlike seaduste ja määrustega. Ohtlike jäätmete kõrvaldamise kohta nõu saamiseks võtke ühendust kohalike ametiasutuste või jäätmekäitlusettevõtetega.
- Analüüsi Fungitell®** komplekti kõigi komponentide ohutuskaarte saab alla laadida ACC veebisaidilt www.acciusa.com.

7.1 Protseduurilised ettevaatusabinõud

Analüüsi Fungitell® puhul tuleb järgida rangelt meetodikat ja nõudeid analüüsi keskkonnale. Analüüsi efektiivsuse saavutamiseks on kriitiline tähtsus tehniku väljaõppel analüüsimetoodi ja saastamise vältimise alal.

- Kasutage häid laboritavasid vastavalt kohalikele määrustele. See analüüs on tundlik saastumise ja pipettimise ebatäpsuse suhtes.
- Looge analüüsi läbiviimiseks puhas keskkond.

- Pange tähele, et analüüsi Fungitell® võivad häirida nii glükaan kui ka inimkehalt, riietelt, konteineritest, veest ja õhutolest lähtuv saastumine seente osakestega.
- Võimalikud saasteallikad: tselluloosi sisaldavad materjalid, nagu marli, pabersalvrätikud ja papp, vatikorkidega klaaspipetid ja tselluloosfiltritega pipetiotsikud. Kirurgilised marli sidemed ja käsnad võivad samuti eritada suures koguses (1→3)-beeta-D-glükaani^{19,22}. Teiste patsientidega seotud saasteallikate kohta vaadake analüüsi jaotist Piirangud.
- Ärge kasutage materjale pärast aegumiskuupäeva möödumist.

7.2 Proovide käitlemine

- Vere võtmine ja seerumi valmistamine peab toimuma vastavalt kehtivatele kohalikele määrustele. Proovide võtmine. Vereproovid tuleb võtta steriilsetesse seerumi ettevalmistamiseks kasutitesse või seerumi eraldamise katsutitesse (SST) seerumi ettevalmistamiseks.
- Proovide säilitamine. Seerumiproove võib säilitada temperatuuril 2–8 °C kuni 15 päeva või külmutata temperatuuril –20 °C kuni 27 päeva või –80 °C kuni 4 aastat.
- Proovide märgistamine. Proovid tuleb selgelt märgistada vastavalt asutuse heakskiidetud tavadele.

8. Protseduur

8.1 Instrumendi seadistamine ja analüüsi programmeerimine

Seadistused võivad sõltuda seadmetest ja tarkvarast. Üldiselt kehtivad järgmised reeglid. Seadke plaatlugeja tarkvara andmeid koguma režiimis Vmean. Kontrollige tarkvara juhendist õigeid seadeid, et tagada väärtuse arvutamine optilise tiheduse muutuse keskmise kiirusena kõigis kogutud andmepunktides. Seadke detektori lugemite intervall minimaalseks, mida tarkvara/instrument analüüsi 40 minutit jooksul võimaldab. Tarkvara lainepikkuse sätted peavad olema 405 nm miinus taust lainepikkusel 490 nm. Soovitatav on kasutada mõlemat lainepikkust, kuid kui kahe lainepikkuse lugemine pole saadaval, lugege analüüsi lainepikkusel 405 nm ja uurige iga patsiendi proovi kineetiislt kõverat segavate mõjude suhtes (üksikasjalikumat teavet vt jaotisest 9.0). Inkubatsioon peab olema seadistatud temperatuurile 37 °C. Enne mõõtmiste alustamist peab toimuma segamine / plaadi raputamine 5–10 sekundi jooksul. Kõvera kju seadistus peab olema lineaarne/lineaarne või samaväärne. Mõõtmised peavad algama viivitusajata.

8.2 Komplektis oleva glükaani standardi ettevalmistamine.

- Lahustage üks vialal glükaani standardit vialail näidatud koguse LRW-ga, et saada lahus konsentratsiooniga 100 pg/ml. Standardi lahustamiseks segage lahus (lahus 1) vähemalt 30 sekundit vorteksegistil keskmise kuni suure kiirusega. Glükaani lahus tuleb hoida temperatuuril 2–8 °C ja kasutada kolme ööpäeva jooksul. Alljärgnevad etapid b–e illustreerivad standardkõvera loomist.
- Valmistage standard konsentratsiooniga 50 pg/ml (lahus 2), segades glükaanivabas katsutis 500 µL LRW-d ja 500 µL lahus 1 (lahus 2). Segage vorteksegistil vähemalt 10 sekundit.
- Valmistage standard konsentratsiooniga 25 pg/ml (lahus 3), segades glükaanivabas katsutis 500 µL LRW-d ja 500 µL lahus 2 (lahus 3). Segage vorteksegistil vähemalt 10 sekundit.
- Valmistage standard konsentratsiooniga 12,5 pg/ml (lahus 4), segades glükaanivabas katsutis 500 µL LRW-d ja 500 µL lahus 3 (lahus 4). Segage vorteksegistil vähemalt 10 sekundit.
- Valmistage standard konsentratsiooniga 6,25 pg/ml (lahus 5), segades glükaanivabas katsutis 500 µL LRW-d ja 500 µL lahus 4 (lahus 5). Segage vorteksegistil vähemalt 10 sekundit.

8.3 Avage aluseline eeltöötluslahus.

Aluseline eeltöötluslahus muundab kolmik-heelikuliseid glükaanid üheahelalisteks glükaanideks^{17,18}, mis on analüüsis reaktiivsemad. Lisaks toimib aluseline pH seerumi proteaaside ja inhibiitorite inaktiveerimiseks, mis võivad analüüsi häirida²⁴.

Visake vialal ära (labori protseduuride kohaselt), kui seda ei kasutata edasises analüüsis, millisel juhul katke vialal Parafilmiga, kasutades Parafilmi seda poolt, mis oli vastu paberkatet.

8.4 Mikrotüiterplaadi ettevalmistus

Valmistage mikrotüiterplaat tarkvaras ette standardite (Std), negatiivsete kontrollide (Neg) ja 21 prooviga (Spl). Soovitame kasutada järgmist paigutust.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		STD1 500	STD1 500		SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	
C		STD2 250	STD2 250		SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	
D		STD3 125	STD3 125		SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	
E		STD4 62,5	STD4 62,5		SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	
F		STD5 31,25	STD5 31,25		SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	
G		Neg	Neg		SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	
H												

Sisestage standardi konsentratsiooniid tarkvaraseadetesse vastavalt kui 500, 250, 125, 62,5 ja 31 pg/ml.

Pange tähele, et sisestatavad standardide konsentratsiooniid on viis korda suuremad, kui saadi eespool loetluses 8.2. Põhjus on selles, et standardi kogus analüüsis on 25 µL lohu kohta, mis on viis korda rohkem kui kasutatava seerumiproovi kogus (vt allpool jaotist 8.5 b). Seega lahjendatakse seerumiproovi tõhusalt standardiga võrdles viis korda. Standardkonsentratsioonide korrutamine viiega kompenseerib selle lahjenduse.

Märkus. Välimisi lohke võib kasutada, kui on näidatud, et välimistes lohkudes saadud tulemused on võrreldavad sisemiste lohkude tulemustega.

Märkus. Standardkõvera negatiivseid kontrolle ei kasutata.

8.5 Seerumi ja aluselise eeltöötluslahuse lisamine.

- Alustage seerumi külmutatud proovid toatemperatuuril. Segage proovid vorteksegistil hoolikalt – vähemalt 30 sekundit keskmise kuni keskmise-suure kiirse seadetsega.
- Kandke 5 µL seerumiproovist vähemalt kahte vastavasse lohu (Ük). Korrage iga seerumiprooviga.
- Lisage igasse seerumit sisaldavasse lohu 20 µL aluselist eeltöötluslahust. Veenduge, et seerumi ja eeltöötluse tilgad puutuksid omavahel kokku. Märkus. Etapid b ja c võib läbi viia vastupidises järjekorras vastavalt tehniku eelistustele. Märkus. Juhusliku saastumise vältimiseks pange mikroplaadi kaas tagasi pärast proovide ja reagentide lohkudesse lisamist.
- Lokustage plaati 5–10 sekundit lohkude suvi segamiseks (kasutada võib lugeja plaadi loksutamise funktsiooni) ja seejärel inkubeerige 10 minutit inkubeerivas plaadilugejas temperatuuril 37 °C.

8.6 Fungitell®-i reagenti lahustamine.

Märkus. Seda on mugav teha eeltöötlusinkubatsiooni toimumise ajal. Ühtlaste lahustamisaegade kasutamine suurendab reprodutseeritavust, sest Fungitell®-i reaktsioon algab alates lahustamisest, kuigi madalal tasemel.

Fungitell®-i reagenti ühe viala lahustamiseks lisage 1000 µL pipetiga 2,8 ml LRW-d ja seejärel lisage 2,8 ml lahustamispuhvrit Pyrosol. Katke vialal Parafilmiga, kasutades Parafilmi seda poolt, mis oli paberaluse poole suunatud. Keerutage vialal ettevaatlikult täieliku lahutamise saamiseks – ärge kasutage vorteksegistit.

8.7 Negatiivsete kontrollide ja glükaani standardite lisamine.

Seerumi eeltöötlusinkubatsiooni (jaotis 8.5 d) lõpus võtke plaid inkubeerivast plaadilugejast välja ja lisage plaadide standardid ja negatiivsed kontrollid. Soovitav standardi konsentratsiooni muutmine.

- Lisage 25 µL LRW-d lohkudesse G2 ja G3.
- Lisage 25 µL 6,25 pg/ml konsentratsiooniga standardi lahus 5 lohkudesse F2 ja F3 märgistusega 31,25 pg/ml.
- Lisage 25 µL 12,5 pg/ml konsentratsiooniga standardi lahus 4 lohkudesse E2 ja E3 märgistusega 62,5 pg/ml.
- Lisage 25 µL 25 pg/ml konsentratsiooniga standardi lahus 3 lohkudesse D2 ja D3 märgistusega 125 pg/ml.
- Lisage 25 µL 50 pg/ml konsentratsiooniga standardi lahus 2 lohkudesse C2 ja C3 märgistusega 250 pg/ml.
- Lisage 25 µL 100 pg/ml konsentratsiooniga standardi lahus 1 lohkudesse B2 ja B3 märgistusega 500 pg/ml.

8.8 Fungitell®-i reagenti lisamine ja plaadi inkubeerimise protseduur.

- Lisage 100 µL Fungitell®-i reagenti reguleeritava automaatpipeti abil kõigisse (negatiivseid kontrolle, standardide ja proove sisaldavate) lohkudesse.
- Peate plaat mikroplaadi lugejasse (mis on võrdstatud temperatuuriga 37 °C), jättes kaane peale, ja loksutage 5–10 sekundit.

Lugege plaati **kaaneta** 405 nm minus 490 nm, 40 minutit temperatuuril 37 °C. Märkus. Kui instrument ei võimalda loksutamise ja lugemise vahel kaant eemaldada, jätke kaaneta lugemiseks kaas ära.

9. Tulemuste arvutamine.

Kogve ja analüüsite andmeid järgmiselt: uurige analüüsitavate proovide kineetiisil jooniseid ja otsige mustreid, mis on väljajpool standardest sujuvat tõusu. Jooniseid, mis näitavad optilist interferentsi (s.t mille kineetiised mustrid neid standardeid ei järgi) ei tohi kasutada. Arvutage optilise tiheduse muutumise keskmise kiirsi (milli-neeldumisühikut minutis) kõikides ajapunktides vahemikus 0 kuni 40 minutit (tarkvaraga). Interpoleerige proovi (1→3)-beeta-D-glükaani konsentratsiooni standardkõverast (tarkvaraga).

10. Kvaliteedi kontroll

- Standardkõvera (lineaarne vs lineaarne) korrelatsioonioefitsent (r) peab olema ≥0,980.
- Lohud, mis sisaldavad 25 µL LRW-d, on negatiivsed kontrollid. Negatiivsete kontrollide määra tulemused (milli-neeldumisühikutes minuti kohta) peavad olema alla 50% kõige väiksema konsentratsiooniga standardi määrast. Kui see nii ei ole, tuleb analüüsi korrata täiesti uute reagentidega.
- Keerukate proovide käitlemine. Kui laborant avastab sogase, värvi muutnud või hägusa (nt olulise hemolüsiga, lipeimelisse või liigselt bilirubiini sisaldavas) proovi analüüsi ebatavalisil kineetiisil nähte, tuleb proovi lahjendada LRW-ga ja uuesti analüüsida. Lahjendust tuleb tulemuste esitamisel arvestada ning tulemused tuleb korrutada lahjendusteguriga. Tavalisel sisestatakse lahjendustegur proovi tarkvara seadetesse ja korrektsioon toimub automaatselt.

Märkus.

- Kõik analüüsi kasutajad peavad rakendama kvaliteedikontrolli programmi, et tagada analüüsi tegemise oskus nende kohalike kohaldatavate eeskirjade kohaselt.
- Seerumi kontrollproove (negatiivsed, piirväärtuse lähedased või tugevalt positiivsed) on soovitatav analüüsida edasisete laborikontrollide ja hea laboritava kontekstis. Need ei sisaldu Fungitell®-i komplektis.

11. Tulemuste tõlgendamine
NEGATIIVNE TULEMUS
(1→3)-beta-D-glükaani kontsentratsioone <60 pg/ml tõlgendatakse negatiivse tulemusena.

Analüüsi tegev labor peab teavitama analüüsi tellivat arsti, et mitte kõik seeninfektsioonid ei suurenda seerumi (1→3)-beta-D-glükaani sisaldust. Mõned seened, näiteks krüptokokkide perekond3,4, toodavad (1→3)-beta-D-glükaani väga väikesed kogustes. Nuthallikulaadsed (Mucorales), näiteks *Absidia*, *Mucor* ja *Rhizopus*⁴, teadaolevalt (1→3)-beta-D-glükaani ei produtseeri. Ks *Blastomyces dermatitidis* toodab pärmsene faasis (1→3)-beta-D-glükaani vähe ning blastomükooosiga patsientidel ei ole (1→3)-beta-D-glükaani sisaldused tavaliselt analüüsiga Fungitell® määratavad⁵.

EBAMÄÄRANE TULEMUS

Väärtusi 60–79 pg/ml ei peeta veenvaks. Soovivat on korduv seerumi proovide võtmine ja analüüsimine. Proovide saged võtmine ja analüüsimine parandab diagnoosi õigsust.

POSITIIVNE TULEMUS

(1→3)-beta-D-glükaani väärtusi ≥80 pg/ml loetakse positiivseteks tulemusteks. Positiivne tulemus ei määrate haiguse olemasolu ning seda tuleb diagnoosimisel kasutada koos teiste kliiniliste leidudega.

12. Analüüsi piirangud

- Selle analüüdi seerumikontsentratsiooni võivad mõjutada seeninfektsiooni asukoht kudedes¹⁹, kapseldumine ja teatud seente tootetav (1→3)-beta-D-glükaani kogus. (1→3)-beta-D-glükaani vähenenud sisenemine vereringesse võib mõjutada teatud tuvastada teatud seeninfektsioone.
- Mõnel inimesel esinevad kõrgenenud (1→3)-beta-D-glükaani tasemed ebamäärase väärtuste alasse jäävates kontsentratsioonides. Sellistel juhtudel on soovivat teha jälgimiseks lisauuringuid.
- Patsienti uurimise sagedus sõltub seeninfektsiooni esinemise suhtelisest riskist. Riskirühma patsientidel soovitatakse analüüsi teha vähemalt kaks kuni kolm korda nädalas.
- Positiivsed tulemusi on saadud hemodialüüsi saavatel patsientidel^{19,20,18}, teatud fraksioneeritud vereotodetega, näiteks seerumi albumiini ja immuunglobuliinidega^{21,22} ravitud patsientidel ja glükaani sisaldavate marlikega ja kirurgiliste käsnadega kokkupuutumud proovidest või uuringus osalejatel. Kirurgilisel kokkupuutel (1→3)-beta-D-glükaani sisaldavate käsnade ja tamponidega on vajalik 3–4 päeva möödumine seerumi (1→3)-beta-D-glükaani kontsentratsiooni langemiseks baasväärtuse^{21,22}. Seetõttu tuleb kirurgiliste patsientide proovide võtmise aja puhul seda asjaolu arvesse võtta.
- Kanna või sõrme kapillaarvere punktsiooniga saadud proovide kasutamine ei ole vastuvõetav, sest on näidatud proovide saastumist uuringukoha ettevalmistamiseks kasutatava alkoholis niisutatud tamponiga (ja potentsiaalselt ka vere kogunemisega nahapinnale). Senistes uuringutes ei ole veeniteid kaudu või veenipunktsiooniga võetud proovidel erinevusi täheldatud^{21,27}.
- (1→3)-beta-D-glükaani valepositiivsed tulemusi põhjustavate tegurite põhjaliku ülevaadet vt väljaandest Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)³⁹.
- Analüüsitulemused on määratud täiskasvanud uuringus osalejatel. Imikute ja laste normaalseid ja piirväärtusi uuritakse^{28,29}.

13. Analüüsi omadused

13.1 Piirväärtused ja oodatavad väärtused

Mitmekeskuseline perspektiivuuring³¹ viidi läbi analüüsi Fungitell® diagnostilise tundlikkuse ja diagnostilise spetsiifilisuse määramiseks (vt võrdlustesti alloolp), mis näitas, et beta-glükaani väärtused suurenevad mitmete seeninfektsioonide korral. Kui 80 pg/ml või kõrgema väärtuse korral esinevad tunnused ja sümptomid, on seeninfektsiooni olemasolu prognoosi väärtus uuringus osalejäl vahemikus 74,4–91,7%. 60 pg/ml ja väiksema väärtuse ning tunnuste ja sümptomite puudumise korral on analüüsi negatiivne prognoosi väärtus vahemikus 65,1–85,1%.

13.2 Kliiniline toimivus

Analüüsi Fungitell® omaduste valideerimiseks viidi läbi mitmekeskuseline prospektiivne uuring³¹. Analüüsimetodid võrdeldi mtükooside ja fungeemiate tuvastamise teiste standardsete meetoditega (nt verekülv, bioptaaside histopatoloogiline uurimine ja radioloogilised tunnused).

Analüüsimetodiga uuriti kolmsada viitkümmend üheksat (359) uuringus osalejat. Igalt uuringus osalejalt võeti üks proov. Madala riskiga uuringus osalejate hulka kuulusid ka ilmselt terved inimesed ning kliinikute patsiendid, kelle hospitaliseerimise põhjuseks olid muud haigused kui seeninfektsioonid. Uuringus osalejad värvati Ameerika Ühendriikides kuues kliinilises uuringukeskuses. Neljas kliinilises uuringukeskuses analüüüsi 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.

• **Diagnostiline tundlikkus**

Tundlikkusi kogu uuringus osalejate populatsioonis (359), sealhulgas krüptokokkoosiga patsientidel, oli 65,0% ([95% usaldusvahemik 60,1–70,0%]) (tabel 1).

• **Diagnostiline spetsiifilisus**

Spetsiifilisus oli 81,1% (usaldusvahemik 77,1–85,2%). Kui analüüüsi 170 seeninfektsiooni suhtes negatiivset ja ilmselt tervet isikut, oli analüüüsi spetsiifilisus 86,5% (usaldusvahemik 82,8–90,1%). Kui lisati veel 26 uuritavat, kellel seeninfektsiooni ei esinenud, kuid esinesid muud haigused, saadi spetsiifilisus 81,1% (usaldusvahemik 77,1–85,2%).

Tabel 1	ACC analüüsitulemused piirmääraga 60–80 pg/ml uuringukeskuste järgi									
	Pos/klin Pos	Tõendatud/tõenäoline tundlikkus ≥= 80 pg/ml		Spetsiifilisus <60 pg/ml			Etamäärane 60<=X<80		Kokku	
		Tundlikkus	Positiivne prognoosiväärtus	Neg/klin Neg	Spetsiifilisus	Negatiivne prognoosiväärtus				
	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	

Kui ACC (359 proovi) ja kliiniliste keskuste (285 proovi) tulemusi võrdeldi kliinilise diagnoosiga, oli tundlikkus ACC puhul 64,3% (usaldusvahemik 58,8–69,9%) ja uuringukeskustes 61,5% (usaldusvahemik 55,9–67,2%). Spetsiifilisus oli ACC puhul 86,6% (usaldusvahemik 82,7–90,6%) ja uuringukeskustes 79,6% (usaldusvahemik 74,9–84,3%).

Kandidoos

Prospektiivses uuringus osales 107 kinnitatud kandidoosi diagnoosiga patsienti. Analüüsiga Fungitell® saadi positiivne tulemus 83 uuringus osalejal 107-st.

Ettevõttele Associates of Cape Cod, Inc. saadeti sada seitskümmend viis kandidoosi teegiproovi. Analüüsiga saadi positiivne tulemus 145 proovis 175-st.

Aspergilloos

Kokku olid aspergilloosi suhtes positiivsed 10 osalejat. 8 osalejat 10-st olid analüüsi järgi positiivsed.

Fusarioos

Kolm osalejat olid fusarioosi suhtes positiivsed. 2 osalejat 3-st olid analüüsi järgi positiivsed.

Seenevastane ravi

Seenevastase ravi olemasolu või puudumine ei mõjutanud analüüsi tundlikkust statistiliselt oluliselt. 118 isikul saadi invasiivse seeninfektsiooni ja seenevastase ravi korral positiivne tulemus. 82 olid testi järgi positiivsed (tundlikkus 69,5%; usaldusvahemik 61,2–77,8%). Lisaks osutusid kakkskümmend neli (24) osalejat positiivseteks, kellest ükski ei saanud seenevastast ravi. 18 olid testi järgi positiivsed (tundlikkus 75%; usaldusvahemik 57,7–92,3%).

13.3 Analüüsitulemuste korreleerumine

Neljas kliinikute uuringukeskuses analüüüsi ja uuriti kokku 285 proovi. Uuringukeskuste analüüsitulemused korreleerusid kvantitatiivselt 96,4% ulatuses Associates of Cape Cod, Inc. tulemustega. Associates of Cape Cod, Inc. tulemused korreleerusid erinevate uuringukeskuste tulemustega 90,6–99,2% ulatuses.

13.4 Kordustäpsus

Analüüsi Fungitell® kordustäpsuse (st korratavus ja reprodutseeritavus) hindamiseks kasutati kümmet (10) erinevat proovi, millest igaühte testiti kolmes uuringukeskuses kolmel eri päeval. Analüüsisisene varieeruvus oli vahemikus 0,9–28,9% ja see oli korratavuse mõõt. Analüüside vaheline varieeruvus oli vahemikus 3,9–23,8% ja see oli korratavuse mõõt. Neli (4) negatiivset proovi jäeti mõlemast analüüsist välja.

13.5 Mõõtmisvahemik ja linearsus

Tulemusi väljendatakse seerumi kontsentratsioonina pikogrammides milliliitris ja vahemikus alates mittedääratavast (<31 pg/ml) kuni väärtuseni >500 pg/ml ning need printitakse välja tarkvara abil või loetakse standardkõveralt. Täpsete tulemuste saamiseks kontsentratsioonil üle 500 pg/ml on vajalik proovi lahjendamine LAL reagendiveega ja uus analüüsimine. Nagu on näidatud jaotises Kvaliteedi kontroll, peab analüüsi Fungitell® mõõtmisvahemikku hõlmama standardkõvera (lineaarne vs lineaarne) korrelatsioonioefitsient (r) olema ≥0,980 ja negatiivsete kontrollide määra tulemused (milli-neeldumisühikutes minuti kohta) alla 50% kõige väiksema kontsentratsiooniga standardisüstikutest. Kui see nii ei ole, tuleb analüüsi korrata täiesti uute reagentidega.

13.6 Häirivad ained

Analüüsiga Fungitell® täpsete tulemuste saamist võivad häirida järgmised prooviga seotud seisundid.














- Värvi muutnud või hägusad, näiteks olulise hemolüüsilise, lipemiselise või liigselbi biirubiini sisaldavad proovid võivad optiliselt analüüüsi häirida. Selliste proovide analüüsimisel peab analüüsitulemusi kontrollima optiliste segajate tõendite ja/või ebatavaliste kineetiliste mustrite suhtes.

- Immunoglobuliin G sisalduv tüsu, nagu see võib olla seerumis hulgmüeloomi korral, võib põhjustada reaktsioonisegu sadestumist pärast Fungitell®-i lisamist eeltõeldeldel seerumile³⁰.

- Selle kirjutamise seisuga ei ole Fungitell® regenti aktiiverivat faktorit G ((1→3)-beta-glükaani tuvastamise element) kirjeldatud peale (1→3)-beta-glükaani. Mõnedes uuringutes, kus on väidetud ristreaktiivsust, on oletatava aktiiveriva materjali töötlemine puhastatud (1→3)-beta-glükaanaasiga signaali kõrvaldamud, näidates, et täheleatud aktiiverimise olti tingitud (1→3)-beta-glükaaniga saastumisest¹. Serimprooteasiga saastumine võib samuti põhjustada analüüsi Fungitell® reaktsioonisegudes para-nitroaniiliini vabanemist, aga serimprooteasid inaktiveeritakse eeltöötlusprotsessi osana.

14. Metaanalüüsid

Peale selle on avaldatud arvukalt retsenseeritud uuringuid invasiivse seenhaiguse diagnoosi seerumi (1→3)-beta-D-glükaanil põhineva toetamise teemal, sealhulgas diagnoosimisvõime metaanalüüse^{32,34,35,36,37}.

	„Kõlblik kuni“		„Vt kasutusjuhendit“
	„Sisaldab piisavalt N analüüsiks“		„Võlatatud esindaja“
	„Partii kood“		„CE-märkis“
	„Meditsiiniseade kasutamiseks in vitro diagnostikas“		„Ainult retsepti alusel kasutamiseks“
	„Kataloogi nr“		„Ettevaatus“
	„Temperatuuripiirang“		„Hoidke päikesevalgusest eemal“
	„Tootja“		

16. Võlatatud esindajad

 Emergo Europe
Prinsessegracht 20, 2514 AP, The Hague, Madalmaad

Austraalia sponsor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park
201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Austraalia

Märkus. Seadmega seoses toimunud ohujuhtumist tuleb teatada tootjale ja selle liikmesriigi pädevale asutusele, kus kasutaja ja/või patsient asub.

17. Kontaktinfo

Ettevõtte peakontor

Associates of Cape Cod, Inc.

124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536-4445 USA
Tel (888) 395-2221 või (508) 540-3444 • Faks +1 (508) 540-8680
E-post custservice@acciusa.com • www.acciusa.com

Ühendkuningriik

Associates of Cape Cod Int’l, Inc.

Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Ühendkuningriik
Tel (44) 151–547–7444 • Faks (44) 151–547–7400

E-post info@acciuik.co.uk • www.acciuik.co.uk

Euroopa

Associates of Cape Cod Europe GmbH

Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Saksamaa

Tel (49) 61 05–96 10 0

18. Versioonijaalugu

Ver 0 kuni II: kolmekordne testimine muudeti kahekordseks testimiseks. Reagendi kvaliteediga vesi asendati LAL-reagendiveega. KCL ja KOH komponendid ühendati leeliseliseks eeltöötluslahuseks. Komplektist eemaldati mikroplaatl, mis on saadaval vastavalt vajadusele (ei kuulu tarnitavasse komplekti). Muudeti EÜ esindaja ja lisati Austraalia sponsor. Tehti väiksemat täpsustusi ja vormistuse muutusi, lisati sümboleid, lisati häirivad ained.

19. Viited

- Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-galucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. *Mycological Journal* 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-1., 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.
- Binder, U., Maurer, E., and Lass-Flori, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. *Lin. Microbiol. Infect.* 20 (Suppl.6): 60-66.
- 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.

6. 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.

7. Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. *New England Journal of Medicine.* 1998: 338:1741-1751.

8. Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H. Yasuoka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet.* 345: 17-20.

9. Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Micro. Rev.* 9: 499-511.

10. Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transp. Infectious Dis.* 2002: 4 (Suppl. 3):32-37

11. Lass-Flori, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 52: 197-205.

12. Nucci, M. and Anaisie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. *Clin. Chest Med.* 30: 295-306.

13. Livintsevna, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grugrich, D.E., Kerkerling, T.M., Brandt, M.E., and Park, B.J. Utility of (1-3)-β-D-galucan testing for diagnosis and monitoring response to treatment during the medical outbreak of fungal meningitis and other infections. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53:618-25.

14. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Sacki, 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.

15. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymp clotting system in *Limulus*. *Thrombosis Res.* 68: 1-32.

16. 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.

17. 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.* 2:17181-190.

18. 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.

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.

20. 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.

21. Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aovaggi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakut, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauze types. *Tohoku J. Exp. Med.* 217: 117-121.

22. Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Coanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-galucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.

23. Held J, Wagner D.β-d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1118-22.

24. 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.

25. 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.

26. Raci, Z., Kočanovaja, I., Lengeroova, M., Weinbergeroova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I., and Mayer, J. Difficulites in using 1,3-β-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies—high frequency of false-positive results and their analysis. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59:1016-22.

27. Postorero B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi,M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguineti, M., and Antonelli, M. 2011 Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. *Crit Care.* 15: R249.

28. 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-galucan test in children. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 924-925.

29. Goudilj, S., Kongoilo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Comu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-Glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. *J. of Maternal-Fetal and Neonatal Med.* 26: 44-48.

30. Issa, N.C., Koo, S., Lynch, R.C., Gay, C., Hammond, S.P., Baden, L.R., Ghobrial, I.M., Finkelman, M.A., and Marty, F.M... 2012 Serum galactomannan and (1→3)-β-D-glucan assays for patients with multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *J.Clin. Microbiol.* 50:1054-6.

31. Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Sacki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical