

Rendeltetésszerű használat

A β-glükán teszt a β-glükán szérumban vagy plazmában történő kvantitatív meghatározására szolgáló in vitro assay.

A teszt összefoglalása és magyarázata

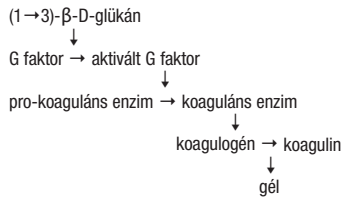
Az (1→3)-β-D-glükán a gombák sejtfalának egyik komponense. A β-glükán teszt hasznos diagnosztikai markere sok invazív gombainfekciónak.

A módszer elve

Az endotoxin aktivitás csökkentése érdekében a mintát hozzáadjuk az előkezelő oldathoz, és felmelegítjük.

Amint az (1→3)-β-D-glükán tartalmazó előkezelte mintát összekeverjük a LAL reagenssel, a G faktor beindítja az alábbi kaszkád reakciót. Ez a reakció gélképződéssel együtt járó turbiditást idéz elő.

A mintában jelen lévő (1→3)-β-D-glükán mennyisége kiszámítható egy arányosság alapján az (1→3)-β-D-glükán mennyisége és a gélképződési idő között, ami egy meghatározott turbiditás eléréséhez szükséges, ismert mennyiségű (1→3)-β-D-glükán esetén.



Reagensok és összetevők

R1: előkezelő oldat

R2: LAL reagens (0,2 ml-hez)

("Limulus amoebocyte lysate", albumin (humán))

kalibrációs kártya, kupaknyitó.

Reagens előkészítése

R1: Használja a készen mellékelt előkezelő oldatot. A reagens kinyitása után ajánlott az azonnali felhasználás; ne tárolja.

R2: Használja a készen mellékelt LAL reagens. A reagens kinyitása után ajánlott az azonnali felhasználás; ne tárolja. characteristics.

Mintavétel és előkészítés

Használjon szérum- vagy plazma mintát.

A mintavételt követően azonnal végezze el az assay-t.

A mintavételt javasolt a helyi és nemzeti előírásokkal összhangban elvégezni. Mivel az összes minta potenciálisan fertőzőnek tekinthető, ezért az ilyen anyagok biztonságos kezelésére vonatkozó helyi vagy nemzeti előírásoknak megfelelően kell eljárni.

Az (1→3)-β-D-glükán stabilitását az alábbiakban foglaltuk össze (saját adatok). Az (1→3)-β-D-glükán stabilitása a mintában a minta karakterisztikájától függ.

Tárolási hőmérséklet	A mintában lévő (1→3)-β-D-glükán stabilitása
-80°C	30 napig stabil
4°C	kb. 6%-os csökkenés 3 nap alatt
25°C	kb. 20%-os csökkenés 2 nap alatt

Teszteljárás

1) Kalibrálás

A gélképződési időre és a koncentrációra vonatkozó adatokat lásd a kalibrációs adatlapon a β-glükán teszt R2: LAL reagens mellékleteként.

Nyomonkövethetőség: a β-glükán koncentrációját a kalibrátor β-glükán teszt reagenssel és a FUJIFILM Wako 1.β-glükán standarddal történő mérése által határoztuk meg. A FUJIFILM Wako 1.β-glükán standardot lentinan használatával készítettük el.

2) Szükséges, külön megvásárolható anyagok / felszerelések

- toxinométer MT-6500.
- Thermostation TS-70/16
- alumínium kupak
- β-glükán mintahígító (külön megvásárolható)
- LAL kontroll (külön megvásárolható)
- hegy: BC Tip EXT / BC Tip 1000-R
- Cooling Station

3) Szükséges, de nem mellékelt anyagok / felszerelések

- vortex
- pipetta
- jégszekrény

4) Mérési eljárás

< Kalibrációs adatok bevétele >

Adja meg a kalibrációs adatokat a kalibrációs kártyára nyomtatott QR-kód leolvasásával, az MT-6500 toxinométerhez csatlakoztatott leolvasó segítségével. A QR-kód sérülése esetén a kalibrációs kártyára kinyomtatott kalibrációs adatok manuálisan is megadhatók. Lásd a készülék kézikönyvét.

< A minta előkezelése >

Adjon 0,1 ml heparinnal kezelt plazmát vagy szérumot 0,9 ml R1: előkezelő oldathoz, és alaposan keverje össze. Melegítse 70°C-on pontosan 10 percig, majd azonnal helyezze jégre legalább 3 percre.

< Standard működési eljárás >

	Minta (szérum/plazma)	Pozitív kontroll (LAL kontroll)	Negatív kontroll (a LAL kontroll oldópufferje)
R2: LAL Reagens (0,2 ml-hez)	Előkezelte minta (0,2 ml)	Előkezelte pozitív kontroll (0,2 ml)	Negatív kontroll (0,2 ml)*

Gélképződési idő (Tg) mérése MT-6500 toxinométerrel (37°C, közepes hullámhossz: 660 nm.)

*Ne használja az R1: előkezelő oldatot negatív kontrollként!

Gélképződési idő definíciója (Tg): a 92%-os vagy annál kisebb transzmittancia arány eléréséhez szükséges reakcióidő.

< Toxinométer MT-6500 használatával >

- 1) Készítse elő az MT-6500 toxinométert a használati utasításban leírt eljárás szerint. Ellenőrizze, hogy a hőmérséklete 37°C (+/-0,5°C).
- 2) Az R2: LAL reagens kinyitáshoz használja a kupaknyitót: az alumínium fólia és a gumi kupak eltávolítása érdekében lassan, 30-40 fokos szögben eltekerve nyissa ki. Fedje le a LAL csövet egy alumínium kupakkal.
- 3) Konfirmálja a tétel azonosítását a kalibrációs adatok és a LAL között.
- 4) Adjon 0,2 ml előkezelte mintát az R2: LAL reagenshez (0,2 ml-hez), vortexelje néhány másodpercig, miután vizuálisan meggyőződött róla, hogy a LAL teljesen feloldódott. Helyezze a LAL csövet az MT-6500 toxinométer mérőcellájába. A LAL-t abba a pozícióba kell behelyezni, ahol a zöld LED fény villog.
- 5) A mérés a LAL cső behelyezése után automatikusan elindul. A zöld LED villogását állandó zöld fény váltja fel.
- 6) A zöld LED az assay befejezése után kialszik.
- 7) Az (1→3)-β-D-glükán assay eredményét a minta gélképződési idejéből (Tg) és a hozzá kapcsolódó kalibrációs adatokból kapjuk meg. Nagyon magas BDG-érték (>600 pg/ml) esetén hígítani kell az előkezelte mintát. (Kérjük, olvassa el a „β-glükán mintahígító” használati utasítását.) Az előkezelte és hígított minta (1→3)-β-D-glükán koncentrációját meg kell szorozni a hígítási faktoral.
- 8) A negatív és a pozitív kontrollnak meg kell felelnie az alábbi feltételeknek:
Negatív kontroll: a Tg 90 perc vagy több. A LAL kontroll hígító pufferét a minta előkezelése nélkül kell negatív kontrollként használni.
Pozitív kontroll: a kalibrációs adatok alapján számított érték az ismert koncentráció ± 20%-án belül van. A pozitív kontrollt a mintához hasonlóan kell előkezelni. A LAL kontrollt kell pozitív kontrollként használni

A készülék vagy a művelet kontaminálódása feltételezhető, ha a negatív kontroll gélképződési ideje 90 percnél kevesebb, vagy a pozitív kontroll eredménye legalább 20%-kal több, mint az ismert koncentráció. Az ilyen esetekben ismételt vizsgálatra van szükség.

Várt értékek

Cut-off érték: 7 pg/ml ((1 → 3)-β-D-glükán esetén)⁽¹⁾⁽¹⁾⁽³⁾

Teljesítmény jellemzők

Érzékenység

- a) Víz vizsgálata esetén (0 pg/ml (1 → 3)-β-D-glükán) a gélképződési idő 90 perc vagy több.
b) Standard oldat vizsgálata esetén (3,3 pg/ml (1 → 3)-β-D-glükán) a gélképződési idő 25 és 55 perc között van.

Specifitás

Ismert koncentrációjú minta vizsgálata esetén az assay értéke az ismert koncentráció ± 20%-án belül van.

Precizitás

[Futtatáson belüli precizitás]

Az alábbiakban a futtatáson belüli precizitás reprezentatív adatai láthatóak. Az egyes plazmaminták 21 ismételt vizsgálatban mért CV%-értéke a 3,4% és 4,7% közötti tartományban volt.

Minta száma	1. minta	2. minta	3. minta
Átlag (pg/ml)	11,8	78,4	373,8
SD (pg/ml)	0,40	2,83	17,55
CV (%)	3,4	3,6	4,7

[Teljes precizitás]

Az alábbiakban a teljes precizitással kapcsolatos reprezentatív adatok láthatóak. Az összes adatot az EP5-A3 CLSI protokollnak megfelelően gyűjtöttük.

Minta száma	1. minta	2. minta	3. minta
Teljes átlag (pg/ml)	10,6	74,1	392,2
Teljes precizitás SD (pg/ml)	0,7	4,9	25,6
Teljes precizitás CV (%)	6,4	6,6	6,5

Pontosság

Ennek a módszernek a pontosságát egy *recovery* tanulmány határozta meg.

Plazmaminta 1.

Hozzáadott (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Mért	10,0	73,2	134,3	275,9
	10,4	73,2	134,3	250,5
	10,2	67,4	134,3	290,0
átlag (pg/ml)	10,2	71,3	134,3	272,1
Kapott (pg/ml)		61,1	124,1	261,9
Visszanyerés %	-----	81,5 %	82,7 %	87,3 %

Plazmaminta 2.

Hozzáadott (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Mért	73,2	144,6	239,0	378,2
	73,2	139,6	228,2	400,2
	71,2	139,3	228,2	378,2
átlag (pg/ml)	72,5	141,1	231,8	385,5
Kapott (pg/ml)		68,6	159,3	313,0
Visszanyerés %	-----	91,5 %	106,2 %	104,3 %

Plazmaminta 3.

Hozzáadott (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Mért	191,3	250,5	357,8	478,1
	191,3	250,5	338,9	478,1
	183,5	250,5	338,9	478,1
átlag (pg/ml)	188,7	250,5	345,2	478,1
Kapott (pg/ml)		61,8	156,5	289,4
Visszanyerés %	-----	82,4 %	104,3 %	96,5 %

A fenti táblázatban bemutatott koncentrációtartományban az (1 → 3)-β-D-glükán visszanyerési aránya 81,5% és 106,2% között volt.

Linearitás

A mintákban jelen lévő (1 → 3)-β-D-glükán koncentrációk 600 pg/ml-ig lineárisak voltak az értékelés során. Nagyon magas BDG-érték esetén (600 pg/ml <) hígítani kell az előkezelt mintát.

Kérjük, olvassa el a β-glükán mintahígító használati útmutatóját.

Korreláció⁽⁸⁾⁽¹³⁾

		Fungitell		Összes
		Pozitív	Negatív	
WAKO szérum	Pozitív	127	3	130
	Negatív	10	182	192
Összes		137	185	322

Százalékos pozitív egyezés	= 92,7 %
Százalékos negatív egyezés	= 98,4 %
Teljes egyezés	= 96,0 %

		Fungitell		Összes
		Pozitív	Negatív	
WAKO plazma	Pozitív	90	4	94
	Negatív	1	64	65
Összes		91	68	159

Százalékos pozitív egyezés	= 98,9 %
Százalékos negatív egyezés	= 94,1 %
Teljes egyezés	= 96,9 %

Interferáló anyagok

A bilirubinnak és a hemolízisnek nincs szignifikáns hatása az assay-re.

Figyelmeztetés és óvintézkedések

- Kizárólag *in vitro* diagnosztikai felhasználásra.
- Jelen teszt használata és applikációja kizárólag professzionális célokra van fenntartva. Kérjük, olvassa el a vonatkozó nemzeti és helyi előírásokat valamint jogszabályokat.
- Nem alkalmazható belsőleg emberekben és állatokban.
- Amennyiben a reagensek szájba, szembe vagy bőrre kerülnek, azonnal mossa le azokat nagy mennyiségű vízzel. Szükség esetén forduljon orvoshoz.
- Üvegpipetta használata esetén ne pipettázzon szájjal, helyette használjon biztonsági pipettát.
- Ügyeljen arra, hogy az alumínium fólia eltávolítása közben ne vágja meg magát.
- Az R2: LAL reagens humán eredetű anyagokat tartalmaz. Az anyagokat letesztelték és negatívnak találták a következőkre: HBsAg, anti-HIV-1/HIV-2 antitestek és anti-HCV antitest. Mivel az infekció kockázatát nem lehet teljes mértékben kizárni, a termékeket potenciálisan biológiailag veszélyesként kell kezelni éppúgy, mint a betegszérumokat.
- A reagensek megsemmisítésekor a helyi vagy nemzeti előírások szerint járjon el.

A β-d-glükán teszt R1 az 1272/2008 / EK rendelet szerint osztályozott összetevőket tartalmazza. Kérjük tanulmányozza a biztonsági adatlapot!

Figyelmeztetés: attenzione

Piktogramok:



Figyelmeztető mondatok:

H317..... Allergiás bőrreakciót válthat ki.

Óvintézkedésre vonatkozó mondatok:

P280..... Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P303+P361+P353..... HA BŐRRE (vagy hajra) KERÜL: Az összes szennyezett ruhadarabot azonnal le kell vetni. A bőrt le kell öblíteni vízzel (vagy zuhanyozás).
P308+P313..... Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni.

Veszélyes összetevők címkézéséhez:..... metil-izotiazolinon

Gyártó:

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan
Tel.: +81-6-6203-3749 · Fax: +81-6-6203-1917

Európai meghatalmazott képviselő:

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
Fuggerstr. 12, 41468 Neuss, Germany
Tel.: +49-2131-311-272 · Fax: +49-2131-311-110
wako-chemicals.de

< Az eljárással kapcsolatos óvintézkedések >

- Antikoagulánsként heparint javasolunk a plazmával végzett (1→3)-β-D-glükán assay-hez. A plazma centrifugálással történő elválasztásához az alábbi paraméterek ajánlottak: 2-10°C hőmérséklet, 40 másodperc 3000 rpm-en, 10 cm-es rotor sugárral, vagy centrifugálás 10 percig, 150 g-vel* (*1200 rpm, 10 cm-es rotor sugárral).
- A vákuumozott vérvételi cső nem kontaminálódhat az (1→3)-β-D-glükánnal. A vérvételt körültekintően kell elvégezni, hogy elkerülhető legyen az (1→3)-β-D-glükánnal való szennyeződés.
- Az előkezelést közvetlenül a mintavétel követően kell elvégezni. A mintát egy (1→3)-β-D-glükán kontaminációtól mentes tartályban kell tartani. Ha a vizsgálat azonnali elvégzése nem lehetséges, a mintát le kell fagyasztani -80°C-ra. A tárolási időtartam legfeljebb egy hónap.
- Vegye figyelembe az előírt hőmérsékletet és reakcióidőt.
- Jelen assay-t befolyásolhatja a felhasznált eszközök által okozott kontamináció, vagy a kezelési hibákból származó egyéb szennyeződés. Mindig a megfelelő felszerelést kell használni, és figyelmet kell fordítani a művelet során a kontamináció elkerülésére.
- A kereskedelmi forgalomban lévő vákuumozott vérvételi csöveket és hegyeket, illetve üvegárukat csak az (1→3)-β-D-glükánnal való kontaminálódás kizárása után lehet felhasználni.
- Kerülje az (1→3)-β-D-glükánnal való kontaminációt az assay eljárás során.
- A fiola redukált nyomáson lett lezárva. Lassan távolítsa el a dugót, nehogy a por kiszálljon a fiolából.
- Ne érintse meg és ne szennyezze be a LAL-cső alját, mert ezen keresztül történik a fotometriás mérés a toxinométerrel.
- Mielőtt a LAL-csövet a toxinométerbe helyezi, ellenőrizze, hogy nincsenek-e buborékok a keverékben. Buborékok jelenléte esetén távolítsa el azokat a cső aljának megütőgésével.
- Ha a mért érték meghaladja a mérhető tartományt, hígítsa az előkezelt keveréket β-glükán mintahígítóval, majd ismétlje meg a vizsgálatot, és szorozza meg a kapott eredményt a hígítási faktorrall.
- Ha a keverék szignifikáns turbiditást mutat, centrifugálja az előkezelt keveréket 3000 rpm-rel 20 percig, majd a felülúszót használja előkezelt mintaként.

< Az assay-vel kapcsolatos óvintézkedések >

- A reagenseket az előírt körülmények között tárolja. Az egyes reagenstartályok címkéjén feltüntetett lejárati idő letele után már ne használja azokat.
- Ne használja fel a reagenst, ha az véletlenül megfagyott. Ezek a reagensek fals eredményeket adhatnak.
- A reagens kinyitása után ajánlott az azonnali felhasználás; ne tárolja.
- A csomagban lévő tárolóedények és anyagok kizárólag az itt leírt célokra használhatóak, másra nem.
- A reagensek kizárólag az itt leírt eljárásokra és célokra használhatóak.
- A fenti reagenseket csak az itt ismertetett eljárásokra szabad felhasználni. A teljesítmény nem garantálható, ha a reagenseket más eljárások során használják.
- A berendezést a használati utasítás szerint, a megadott feltételek mellett üzemeltesse. A részletekért olvassa el a készülék kézikönyvét.

< A döntéssel, az eredményekkel és a diagnózissal kapcsolatos óvintézkedések >

- Egyes minták nem-specifikus turbiditást mutathatnak az assay során, ami téves eredményekhez vezethet. Gyanú esetén, a nem-specifikus turbiditás jelenlétét vagy hiányát a reakcióidő lefutásával vagy a hígítási teszttel erősítse meg.
- A cellulóz-alapú dialízis membránnal kezelt dializált betegek mintái, illetve a gombákból származó (1→3)-β-D-glükán-alapú (pl. lentinan vagy hasonló anyagok) gyógyszerekkel kezelt betegek mintái fals pozitív eredményeket adhatnak.
- Az (1→3)-β-D-glükán koncentrációja műtétek után átmenetileg emelkedhet.
- A magas endotoxinszint pozitív hibákat eredményezhet.
- Az eredményeket az orvosi vizsgálattal és a beteg tüneteivel együtt kell értelmezni.

< A megsemmisítésre vonatkozó óvintézkedések >

- A reagensek megsemmisítésekor a helyi vagy nemzeti előírások szerint járjon el.
- Az összes eszközt, beleértve a reagenseket és a reagens palackokat, amelyek érintkezésbe kerülnek a mintákkal, potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

Minőségellenőrzés

A klinikai laboratóriumok számára ajánlott egy minőség-ellenőrzési program. Az eljárás teljesítményének figyelemmel kísérése érdekében javasolt az egyes assay eljárások során a FUJIFILM Wako LAL kontroll készlet használata. A kontrollok esetében kapott értékeknek a hozzárendelt értékek ± 20%-án belül kell lenniük.

Tárolási feltételek

Termék	Tárolási körülmények
β-glükán teszt R2: LAL reagens	Tárolás 2-10°C között
β-glükán teszt R1: előkezelő oldat	Tárolás 2-10°C között

Referenciák

- 1) Mori, T., Ikemoto, H., et al.: Evaluation of Plasma (1→3)-β-D-glucan Measurement by the Kinetic Turbidimetric Limulus Test, for the Clinical Diagnosis of Mycotic Infections, Eur. J. Clin. Chem. Biochem., 35, 553-560 (1997).
- 2) Kakinuma, A., Asano, T., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 101, 434-439 (1981).
- 3) Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T. and Iwanaga, S.: A New (1→3)-β-D-glucan Coagulation Pathway Found in Limulus Amebocytes. FEBS Lett., 129, 318-321 (1981).
- 4) Nakamura, T., Morita, T., et al.: Japanese Society for Bacteriology, 38, 781-803, (1983) (in Japanese).
- 5) Stone, B. A. and Clarke, A. E.: Chemistry and Biology of (1→3)-β-D-glucans, 11-12, La Trobe University Press, Victoria, Australia (1992).
- 6) Harada, K., Tsuchiya, M., et al.: 6th Endotoxin Symposium Proceedings, 7-12 (1993) (in Japanese).
- 7) Harada, K., Tsuchiya, M., et al.: 40th Japanese Society for Symposium of Toxins Proceedings, 155-158 (1993) (in Japanese).
- 8) Internal Data
- 9) Lamoth, F., Cruciani, M., et al.: Clin. Infect. Dis., 54, 633-643 (2012).
- 10) Dichtl, K., Seybold, U., et al.: J. Clin. Microbiol., 56, e00286-18 (2018).
- 11) Dichtl, K., Seybold, U., et al.: Infection, 47, 217-224 (2019).
- 12) Mercier, T., Guldentops, E., et al.: J. Clin. Microbiol., 57, e00322-19 (2019).
- 13) De Carolis, E., Sanguinetti, M., et al.: PLoS One., 15, e0236095 (2020).
- 14) Mercier, T., Guldentops, E., et al.: Clin. Infect. Dis., ciae295 (2020).

Rendelési információk

Kód	Termék	Kiszerezés
993-04201	β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution (β-glükán teszt R1: előkezelő oldat)	50 x 0,9 ml
997-04101	β-Glucan Test R2: LAL Reagent (β-glükán teszt R2: LAL reagens)	50 x 0,2 ml-hez
995-04401	LAL Control (LAL kontroll)	
	R1: LAL Control (lyophilized) (R1: LAL kontroll (liofilizált))	10 x 0,5 ml-hez
	R2: Control dissolution buffer (R2: kontroll oldópufer)	10 x 2 ml
999-04301	β-Glucan Sample Diluent (β-glükán mintahígító)	10 x 0,9 ml
995-04901	Aluminum Cap (aluminium kupak)	10 x 10 egység
995-05001	BC Tip EXT (BC hegy EXT)	100 hegy
991-05101	BC Tip 1000-R (BC hegy 1000-R)	100 hegy
993-04701	Toxinometer MT-6500 (Toxinométer MT-6500)	1 egység
999-04801	MT-6500 Extension Module (MT-6500 bővítőmodul)	1 egység
993-03601	Thermostation TS 70/16 (Termoállomás TS 70/16)	1 egység
998-22211	Cooling Station	1 egység