

Verwendungszweck

Der β-Glucan-Test ist ein *In-vitro*-Assay zur quantitativen Bestimmung von β-Glucan in Serum oder Plasma.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

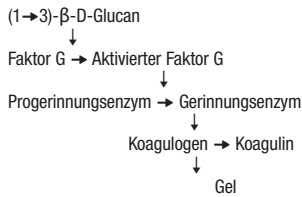
(1→3)-β-D-Glucan ist ein Pilzellwandbestandteil. Der β-Glucan-Test ist ein hilfreicher diagnostischer Marker für viele invasive Pilzinfektionen.

Prinzip der Methode

Die Probe wird zum Hemmen der Endotoxinaktivität in die Vorbehandlungslösung gegeben und erhitzt.

Wenn eine (1→3)-β-D-Glucan enthaltende vorbehandelte Probe mit dem LAL-Reagenz vermischt wird, erfolgt die Auslösung der unten dargestellten Kaskadenreaktion durch Faktor G. Diese Reaktion ruft Trübung und Gelierung hervor.

Die Menge an (1→3)-β-D-Glucan in der Probe lässt sich auf Basis eines proportionalen Verhältnisses zwischen der Menge an (1→3)-β-D-Glucan und der Gelierungszeit berechnen, die erforderlich ist, um eine definierte Trübung mit einer bekannten Menge an (1→3)-β-D-Glucan zu erreichen.



Reagenzien und Inhalte

R1: Pretreatment Solution (Vorbehandlungslösung)

R2: LAL-Reagenz (für 0,2 ml)
(Limulus-Amöbozyten-Lysat, Humanalbumin)

Kalibrierungskarte, Kappenöffner

Reagenz-Vorbereitung

R1: Vorbehandlungslösung ist gebrauchsfertig. Es wird empfohlen, nach dem Öffnen des Reagenzbehälters, das Reagenz sofort zu verwenden und nicht aufzubewahren.

R2: LAL-Reagenz ist gebrauchsfertig. Es wird empfohlen, nach dem Öffnen des Reagenzbehälters, das Reagenz sofort zu verwenden und nicht aufzubewahren.

Probengewinnung und -vorbereitung

Serum oder Plasma als Probe verwenden.

Die Proben sollten sofort verarbeitet werden.

Es wird empfohlen, die Probennahme nach geltenden Bestimmungen vorzunehmen. Die Probenmaterialien müssen als potentiell infektiös behandelt werden. Der Umgang mit solchem Material sollte in Übereinstimmung mit den vor Ort oder im Land geltenden Bestimmungen in Bezug auf den sicheren Umgang geschehen.

Die nachfolgend aufgeführte Tabelle (eigene Daten) enthält eine Übersicht der Stabilität von (1→3)-β-D-Glucan. Die Stabilität von (1→3)-β-D-Glucan in der Probe hängt von den Probenmerkmalen ab.

Lagertemperatur	Stabilität von (1→3)-β-D-Glucan in der Probe
-80 °C	Maximal 30 Tage stabil
4 °C	Etwa 6 % Abnahme nach 3 Tagen
25 °C	Etwa 20% Abnahme nach 2 Tagen

Testverfahren

1) Kalibration

Siehe als Zubehör ein Kalibrationsdatenblatt für Gelierungszeit und Konzentration im β-Glucan-Test R2: LAL-Reagenz.

Rückverfolgbarkeit: Die β-Glucan-Konzentration wurde bestimmt, indem ein Kalibrator mit dem β-Glucan-Test-Reagenz und dem 1. β-Glucan-Standard von FUJIFILM Wako gemessen wurde. Der 1. β-Glucan-Standard von FUJIFILM Wako enthält Lentinan.

2) Benötigte Materialien/Geräte, die separat erhältlich sind:

- Toxinometer MT-6500
- Thermostation TS-70/16
- Aluminium Cap (Aluminiumkappen)
- β-Glucan-Probenverdünner (separat erhältlich)
- LAL-Kontrolle (separat erhältlich)
- Spitzen: BC Tip EXT / BC Tip 1000-R
- Cooling Station

3) Benötigte Materialien/Geräte, nicht im Lieferumfang enthalten:

- Vortexmischer
- Pipette
- Eisbox

4) Messung

<Eingabe Kalibrationsdaten>

Durch Scannen des auf der Kalibrierkarte aufgedruckten QR-Codes mit dem am Toxinometer MT-6500 angeschlossenen Lesegerät die Kalibrationsdaten eingeben.

Wenn der QR-Code nicht funktioniert, können die auf der Kalibrierkarte aufgedruckten Kalibrationsdaten manuell eingegeben werden. Siehe Gerätehandbuch.

<Probenvorbereitung>

0,1 ml heparinisieretes Plasma oder Serum in 0,9 ml von R1 (Vorbehandlungslösung) geben und gut mischen. Auf 70 °C genau 10 Minuten lang erhitzen, danach sofort mindestens 3 Minuten lang mit Eis kühlen.

<Standardverfahren>

	Probe (Serum oder Plasma)	Positive Kontrolle (LAL-Kontrolle)	Negative Kontrolle (Verdünnungspuffer der LAL-Kontrolle)
R2:	Vorbehandelte Probe (für 0,2 ml)	Vorbehandelte positive Kontrolle 0,2 ml	* Negative Kontrolle 0,2 ml

Messung der Zeit bis zur Gelierung (Tg) mit dem Toxinometer MT-6500 (37 °C, mittlere Wellenlänge 660 nm)

*Nicht R1 (Vorbehandlungslösung) für die negative Kontrolle verwenden

Definition der Gelierungszeit (Tg): erforderliche Reaktionszeit, bis 92 % Durchlassgrad oder weniger erreicht ist.

<Verwendung von Toxinometer MT-6500>

- 1) Toxinometer MT-6500 gemäß den Angaben in der Bedienungsanleitung vorbereiten. Prüfen, ob Temperatur 37 °C (± 0,5) beträgt.
- 2) Kappenöffner zum Öffnen von R2: LAL-Reagenz verwenden durch langsames winkliges Drehen um 30–40 Grad den Aluminiumverschluss und Gummistopfen entfernen. LAL-Röhrchen mit der Aluminiumkappe bedecken.
- 3) Überprüfen, ob Chargen von Kalibrierdaten und LAL identisch sind.
- 4) 0,2 ml aufbereitete Probe in R2 (LAL-Reagenz für 0,2 ml) geben und mit Vortexmischer einige Sekunden mischen, nachdem per Sichtprüfung sichergestellt wurde, dass LAL vollständig gelöst ist. Das LAL-Röhrchen in den Messplatz vom Toxinometer MT-6500 einsetzen. Das LAL sollte an einer Stelle eingesetzt werden, wo die grüne LED blinkt.
- 5) Die Messung beginnt automatisch nach dem Einsetzen des LAL-Röhrchens. Die grüne LED hört auf zu blinken und leuchtet ununterbrochen grün.
- 6) Die grüne LED erlischt nach Beendigung der Messung.
- 7) Das Testergebnis für (1→3)-β-D-Glucan wird aus der Zeit bis zur Gelierung (Tg) der Probe und den eingegebenen Kalibrationsdaten ermittelt. Bei einem sehr hohen β-D-Glucanwert (>600 pg/ml) muss die vorbehandelte Probe verdünnt werden. (Siehe Packungsbeilage „β-Glucan Sample Diluent“). Die (1→3)-β-D-Glucankonzentration der mit Vorbehandlung und Probendiluent aufbereiteten Probe muss mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.
- 8) Negative Kontrolle und positive Kontrolle müssen folgende Bedingungen erfüllen:
Negative Kontrolle: Tg beträgt mindestens 90 Minuten.
Control dissolution buffer für die LAL-Kontrolle sollte als negative Kontrolle verwendet werden ohne Probenvorbereitung.
Positive Kontrolle: Der anhand von Kalibrationsdaten errechnete Wert liegt im Bereich von ± 20 % der bekannten Konzentration. Die positive Kontrolle muss wie eine Probe vorbehandelt werden.
Die LAL-Kontrolle sollte als positive Kontrolle verwendet werden.

Kontaminationen an Geräten oder während des Verfahrens sind anzunehmen, wenn die Gelierungszeit der negativen Kontrolle weniger als 90 Minuten oder das Resultat der positiven Kontrolle 20 % oder mehr als die angegebene Konzentration beträgt. In solchen Fällen muss das Ergebnis überprüft werden.

Erwarteter Wert

Grenzwert: 7 pg/ml (von (1→3)-β-D-Glucan)⁽¹⁾⁽¹³⁾

Leistungsmerkmale

Sensitivität

- a) Wenn Wasser (0 pg/ml an (1→3)-β-D-Glucan) getestet wird, beträgt die Gelierungszeit mindestens 90 Minuten.
b) Wenn Standardlösung ((1→3)-β-D-Glucan 3,3 pg/ml) getestet wird, liegt die Gelierungszeit im Bereich von 25 bis 55 Minuten.

Spezifität

Wenn eine Probe mit bekannter Konzentration getestet wird, liegt der Messwert innerhalb des Bereichs von ± 20 % der bekannten Konzentration.

Präzision

[Präzision in der Serie]

Es folgen repräsentative Daten der Präzision in der Serie. Die Ergebnisse der VK (%) für jede Plasmaprobe, die in 21 Replikaten gemessen wurden, liegen im Bereich von 3,4 % bis 4,7 %.

Probe Nr.	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (pg/ml)	11,8	78,4	373,8
SD (pg/ml)	0,40	2,83	17,55
VK (%)	3,4	3,6	4,7

[Gesamtpräzision]

Es folgen repräsentative Daten der Gesamtpräzision. Alle Daten wurden gemäß den CLSI-Richtlinien EP5-A3 erhoben.

Probe Nr.	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Gesamtmittelwert (pg/ml)	10,6	74,1	392,2
Gesamtpräzision SD (pg/ml)	0,7	4,9	25,6
Gesamtpräzision VK (%)	6,4	6,6	6,5

Richtigkeit

Die Richtigkeit dieser Methode wurde mit einer Wiederfindungsuntersuchung ermittelt.

Plasma Probe 1

Zugabe (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Messung	10,0	73,2	134,3	275,9
	10,4	73,2	134,3	250,5
	10,2	67,4	134,3	290,0
Mittelwert (pg/ml)	10,2	71,3	134,3	272,1
Ergebnis (pg/ml)		61,1	124,1	261,9
Wiederfindung %	-----	81,5 %	82,7 %	87,3 %

Plasma Probe 2

Zugabe (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Messung	73,2	144,6	239,0	378,2
	73,2	139,6	228,2	400,2
	71,2	139,3	228,2	378,2
Mittelwert (pg/ml)	72,5	141,1	231,8	385,5
Ergebnis (pg/ml)		68,6	159,3	313,0
Wiederfindung %	-----	91,5 %	106,2 %	104,3 %

Plasma Probe 3

Zugabe (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Messung	191,3	250,5	357,8	478,1
	191,3	250,5	338,9	478,1
	183,5	250,5	338,9	478,1
	188,7	250,5	345,2	478,1
Mittelwert (pg/ml)	188,7	250,5	345,2	478,1
Ergebnis (pg/ml)		61,8	156,5	289,4
Wiederfindung %	-----	82,4 %	104,3 %	96,5 %

Der Wiederfindungswert von (1→3)-β-D-Glucan liegt bei 81,5 %–106,2 % der in den Tabellen angegebenen Bereichen.

Linearität

(1→3)-β-D-Glucankonzentrationen in Proben bis zu 600 pg/ml waren linear in der Auswertung. Bei einem sehr hohen β-D-Glucanwert (> 600 pg/ml) muss die vorbehandelte Probe verdünnt werden. Siehe Packungsbeilage „β-Glucan Sample Diluent“.

Korrelation⁽⁸⁾⁽¹³⁾

		Fungitell		Total
		Positiv	Negativ	
WAKO Serum	Positiv	127	3	130
	Negativ	10	182	192
Total		137	185	322

Prozentsatz positive Übereinstimmung = 92,7 %
Prozentsatz negative Übereinstimmung = 98,4 %
Gesamtübereinstimmung = 96,0 %

		Fungitell		Total
		Positiv	Negativ	
WAKO Plasma	Positiv	90	4	94
	Negativ	1	64	65
Total		91	68	159

Prozentsatz positive Übereinstimmung = 98,9 %
Prozentsatz negative Übereinstimmung = 94,1 %
Gesamtübereinstimmung = 96,9 %

Interferenzen

Bilirubin und Hämolyse haben keinen signifikanten Einfluss auf den Test.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Für *In-vitro*-Diagnostik.
- Die Nutzung und Anwendung dieses Tests ist ausschließlich ausgebildetem Fachpersonal vorbehalten. Es gelten die einschlägigen nationalen und regionalen Vorschriften und Gesetze.
- Nicht zur *In-vivo*-Anwendung bei Menschen und Tieren.
- Bei Kontakt der Reagenzien mit dem Mund, den Augen oder der Haut umgehend mit viel Wasser spülen. Falls erforderlich, einen Arzt hinzuziehen.
- Bei Verwendung einer Glaspipette nicht mit dem Mund ansaugen, sondern eine Sicherheitspipette verwenden.
- Darauf achten, dass man sich beim Entfernen des Aluminiumverschlusses vom Fläschchen nicht schneidet.
- Das R2: LAL-Reagenz enthält Substanzen menschlichen Ursprungs. Die Substanzen wurden getestet und ergaben negative Befunde für HBsAg, Anti-HIV-1/HIV-2-Antikörper und Anti-HCV-Antikörper. Da sich das Risiko einer Infektion nicht mit Sicherheit ausschließen lässt, müssen die Produkte als potenziell biogefährlich wie Patientensera behandelt werden.
- Die Reagenzien sind entsprechend den vor Ort und im Land geltenden Bestimmungen zu entsorgen.

β-Glucan Test R1 enthält in ihren Komponenten folgende gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 eingestufte Zubereitungen. Bitte Sicherheitsdatenblatt beachten!

Signalwort: Achtung



Gefahrenhinweise:	H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
Sicherheitshinweise:	P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
	P303+P361+P353	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen (oder duschen).
	P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Gefährliche Bestandteile

zur Kennzeichnung: 2-Methylisothiazol-3(2H)-one

<Vorsichtsmaßnahmen für das Verfahren>

- Heparin wird als Antikoagulans beim (1→3)-β-D-Glucan-Test in Plasma empfohlen. Die Plasmaseparation durch Zentrifugieren sollte bei 2–10 °C 40 Sekunden lang bei 3.000 U/min mit einem Rotorradius von 10 cm oder 10 Minuten langes Zentrifugieren mit 150 g* erfolgen.
*1.200 U/min mit einem Rotorradius von 10 cm.
- Vakuum-Blutabnehmeröhrchen dürfen nicht mit (1→3)-β-D-Glucan kontaminiert sein. Die Blutabnahme muss vorsichtig erfolgen, damit es nicht zu einer Kontamination mit (1→3)-β-D-Glucan kommt.
- Die Vorbehandlung sollte sofort nach der Abnahme erfolgen. Die Probe in einem nicht mit (1→3)-β-D-Glucan kontaminierten Behälter aufbewahren und bei -80 °C zur Lagerung einfrieren, wenn die Analyse nicht sofort möglich ist. Die Lagerungsdauer darf maximal einen Monat betragen.
- Vorgeschriebene Reaktionstemperatur und Reaktionszeit ist zu beachten.
- Der Test kann durch Gerätschaften oder Handhabungsfehler kontaminiert werden. Geeignete Ausrüstung ist zu verwenden, und es ist auf das Vermeiden von Kontamination während des Gebrauchs zu achten.
- Handelsübliche Vakuum-Blutabnehmeröhrchen und Spitzen oder Glas-ausrüstung für Vorräte sind nur nach Ausschluss einer Kontamination mit (1→3)-β-D-Glucan zu verwenden.
- Es ist streng darauf zu achten, dass eine Kontamination mit (1→3)-β-D-Glucan während des Testverfahrens vermieden wird.
- Das Fläschchen ist mit Unterdruck versiegelt. Den Stöpsel langsam entfernen, damit kein Pulver aus dem Fläschchen verloren geht.
- Den Boden des LAL-Röhrchens nicht berühren oder verschmutzen, weil dieser Teil zur photometrischen Messung durch das Toxinometer verwendet wird.
- Vor dem Einsetzen des LAL-Röhrchens in das Toxinometer prüfen, dass keine Blasen in der Mischung sind. Wenn Blasen vorhanden sind, diese durch leichtes Tippen gegen die Röhrchenunterseite entfernen.
- Wenn der Messwert über den Messbereich hinausgeht, die vorbehandelte Mischung mit β-Glucan Sample Diluent verdünnen, den Test wiederholen und das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.
- Bei signifikanter Trübung der vorbehandelten Mischung die Mischung mit 3.000 U/min 20 Minuten lang zentrifugieren und die überstehende Flüssigkeit als vorbehandelte Probe verwenden.

<Vorsichtsmaßnahmen für den Test>

- Die Reagenzien unter den angegebenen Bedingungen lagern. Reagenzien nach dem auf dem Reagenzbehälteretikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Versehentlich gefrorene Reagenzien nicht verwenden. Solche Reagenzien können falsche Resultate ergeben.
- Es wird empfohlen, nach dem Öffnen des Behälters der Reagenzien, diese sofort zu verwenden und nicht aufzubewahren.
- Behälter und andere Materialien in der Packung für keine anderen Zwecke verwenden.
- Die oben beschriebenen Reagenzien für keine anderen Zwecke als die in dieser Packungsbeilage beschriebenen verwenden.
- Die oben beschriebenen Reagenzien in keinem anderen Verfahren als den in dieser Packungsbeilage beschriebenen verwenden. Wenn die Reagenzien in anderen Verfahren verwendet werden, kann die Leistung nicht garantiert werden.
- Die Instrumente gemäß den Bedienungsanleitungen unter angemessenen Bedingungen einsetzen. Näheres ist den Anleitungen zu entnehmen.

<Vorsichtsmaßnahmen für Bestimmung/Ergebnis und Diagnose>

- Einige Proben weisen unspezifische Trübung bei der Messung auf, die falsche Resultate ergeben können. Vorhandensein oder Nichtvorhandensein unspezifischer Trübungen durch den Reaktionszeitverlauf oder einen Verdünnungstest überprüfen, wenn ein Resultat Anlass zu Zweifeln gibt.
- Proben von Dialysepatienten, die mit Zellulose-Dialysemembranen behandelt wurden, oder von Patienten, die mit (1→3)-β-D-Glucan-Arzneimitteln von Pilzen, wie Lentinan oder ähnlichen Substanzen, behandelt wurden, können falsch positive Resultate ergeben.
- Die (1→3)-β-D-Glucan-Konzentration kann nach Operationen vorübergehend ansteigen.
- Hohe Endotoxinwerte können falsch-positive Ergebnisse ergeben.
- Die Ergebnisse sind im Zusammenhang mit einer ärztlichen Beurteilung und Patientensymptomen zu verwenden.

<Vorsichtsmaßnahmen für die Entsorgung>

- Entsorgung der Reagenzien muss gemäß den örtlichen oder nationalen Vorschriften erfolgen.
- Alle Geräte, einschließlich Reagenzien und Reagenzfläschchen, die mit Proben in Kontakt kommen, sind als potenziell infektiös zu betrachten.

Qualitätskontrolle

Eine Qualitätskontrollroutine wird allen klinischen Laboratorien empfohlen. Die Analyse mithilfe von FUJIFILM Wako LAL-Kontroll-Set wird für jeden Test zur Kontrolle der Leistung des Verfahrens empfohlen. Die für die Kontrolle erzielten Werte müssen im Bereich von ± 20 % der vorgegebenen Werte liegen.

Lagerbedingungen

Produkt	Lagerbedingungen
β-Glucan Test R2: LAL Reagent	Bei 2–10 °C lagern
β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution (Vorbehandlungslösung)	Bei 2–10 °C lagern

Literatur

- 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).
- Kakinuma, A., Asano, T., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 101, 434-439 (1981).
- Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T. und Iwanaga, S.: A New (1→3)-β-D-glucan Coagulation Pathway Found in Limulus Amebocytes. FEBS Lett., 129, 318-321 (1981).
- Nakamura, T., Morita, T., et al.: Japanese Society for Bacteriologies, 38, 781-803, (1983) (auf Japanisch).
- Stone, B. A. und Clarke, A. E.: Chemistry and Biology of (1→3)-β-D-glucans, 11-12, La Trobe University Press, Victoria, Australien (1992).
- Harada, K., Tsuchiya, M., et al.: 6th Endotoxin Symposium Proceedings, 7-12 (1993) (auf Japanisch).
- Harada, K., Tsuchiya, M., et al.: 40th Japanese Society for Symposium of Toxins Proceedings, 155-158 (1993) (auf Japanisch).
- Interne Daten
- Lamoth, F., Cruciani, M., et al.: Clin. Infect. Dis., 54, 633-643 (2012).
- Dichtl, K., Seybold, U., et al.: J. Clin. Microbiol., 56, e00286-18 (2018).
- Dichtl, K., Seybold, U., et al.: Infection, 47, 217-224 (2019).
- Mercier, T., Guldentops, E., et al.: J. Clin. Microbiol., 57, e00322-19 (2019).
- De Carolis, E., Sanguinetti, M., et al.: PLoS One., 15, e0236095 (2020).
- Mercier, T., Guldentops, E., et al.: Clin. Infect. Dis., ciaz295 (2020).

Bestellinformationen

Best.-Nr.	Produkt	Packung
993-04201	β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution	50 x 0,9 ml
997-04101	β-Glucan Test R2: LAL Reagent	50 x für 0,2 ml
995-04401	LAL Control R1: LAL Control (lyophilized) R2: Control dissolution buffer	10 x für 0,5 ml 10 x 2 ml
999-04301	β-Glucan Sample Diluent	10 x 0,9 ml
995-04901	Aluminum Cap	10 x 10 Einheiten
995-05001	BC Tip EXT	100 Spitzen
991-05101	BC Tip 1000-R	100 Spitzen
993-04701	Toxinometer MT-6500	1 Einheit
999-04801	MT-6500 Extension Module	1 Einheit
993-03601	Thermostation TS 70/16	1 Einheit
998-22211	Cooling Station	1 Einheit