

Intenti d'uso

Il Test β-Glucano è un test in vitro per la determinazione quantitativa di β-glucano nel siero o plasma.

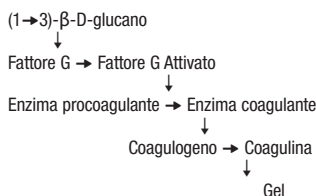
Sintesi e spiegazione del test

Il (1→3)-β-D-glucano è un componente della parete cellulare fungina. Il Test β-Glucano è un marcatore diagnostico utile per molte infezioni fungine invasive.

Principio del metodo

Per eliminare l'attività dell'endotossina o altro materiale contaminante, il campione è pretrattato e successivamente riscaldato.

Una volta che il campione pretrattato contenente (1→3)-β-D-glucano viene miscelato con il reagente LAL, il Fattore G attiva la reazione a cascata di seguito descritta. Questa reazione induce la torbidità fino alla gelificazione. La quantità di (1→3)-β-D-glucano nel campione può essere calcolata grazie ad una relazione proporzionale tra quantità di (1→3)-β-D-glucano e tempo di gelificazione necessario per raggiungere una certa torbidità con una quantità nota di (1→3)-β-D-glucano.



Reagenti ed ingredienti

R1: Pretreatment Solution (Soluzione di pretrattamento)

R2: LAL Reagent (Reagente LAL) per 0,2 mL
(Lympulus amebocite lysate, albumina (umana))

Card di calibrazione, stappa provette.

Preparazione dei reagenti

R1: Utilizzare la soluzione di pretrattamento così come fornita. Dopo l'apertura dei reagenti si raccomanda di utilizzarli subito e di non conservarli.

R2: Utilizzare il reagente LAL così come fornito. Dopo apertura dei reagenti si raccomanda di utilizzarli subito e di non conservarli.

Raccolta dei campioni e preparazione

Utilizzare campioni di siero o plasma eparina.

Eseguire il test subito dopo la raccolta. Si raccomanda di raccogliere i campioni secondo le normative locali e nazionali. Dato che tutti i campioni sono potenzialmente infetti, si raccomanda di maneggiarli conformemente alle normative locali o nazionali sulla gestione sicura di questi materiali.

La stabilità del (1→3)-β-D-glucano viene riassunta di seguito. Tutti i risultati ottenuti in merito sono stati eseguiti con valutazioni interne. La stabilità del (1→3)-β-D-glucano potrebbe essere differente in base alle caratteristiche del campione.

Temperatura di conservazione	Stabilità del (1→3)-β-D-glucano nel campione
-80 °C	Stabile fino a 30 giorni
4 °C	Circa il 6 % di diminuzione dopo 3 giorni
25 °C	Circa il 20 % di diminuzione dopo 2 giorni

Procedura

1) Calibrazione

Vedere la scheda dei dati di calibrazione per il tempo di gelificazione e la concentrazione fornita come accessorio in R2 (kit reagente LAL).

Tracciabilità: la concentrazione del β-glucano è stata determinata attraverso la misurazione di un calibratore con il reagente del Test β-Glucano e il Primo standard FUJIFILM Wako β-Glucano. Il Primo standard FUJIFILM Wako β-Glucano è stato preparato utilizzando lentinano.

2) Materiali/dispositivi richiesti e disponibili separatamente

- Strumento Toxinometer MT-6500
- Thermostation TS-70/16
- Aluminium Cap
- β-Glucan Sample Diluent (Tampone di diluizione β-Glucano) disponibile separatamente
- LAL Control (Controllo LAL) disponibile separatamente
- Puntali: BC Tip EXT / BC Tip 1000-R
- Cooling Station

3) Materiali/dispositivi richiesti e non forniti

- Vortex
- Pipette
- Ice box

4) Procedura di misurazione

<Inserimento dati di calibrazione>

Inserire i dati di calibrazione mediante il lettore codice a barre connesso allo strumento Toxinometer MT-6500, leggendo il QR code inserito nella card di calibrazione. Nel caso in cui fallisca la lettura mediante QR code, è possibile inserire i dati manualmente. Per maggiori informazioni, riferirsi al manuale dello strumento.

<Pretrattamento del campione>

Aggiungere 0.1 ml di siero o plasma eparina in 0,9 ml di R1 (soluzione di pretrattamento) e miscelare bene. Scaldare i campioni a 70 °C esattamente per 10 minuti e successivamente raffreddare subito con ghiaccio per almeno 3 minuti.

<Procedura operativa standard>

	Campione (siero o plasma)	Controllo positivo (controllo LAL)	Controllo negativo (tampone di dissoluzione del controllo LAL)
R2: reagente LAL (per 0,2 ml)	0,2 ml di campione pretrattato	0,2 ml di controllo positivo pretrattato	0,2 ml di controllo negativo*

Misurare il tempo di gelificazione (tg) con il Toxinometro MT-6500 (37 °C lunghezza d'onda media 660 nm)

*non utilizzare R1: R1 (Soluzione di pretrattamento) per il controllo negativo

Definizione del tempo di gelificazione (tg): tempo di reazione richiesto per il raggiungimento di un rapporto di trasmittanza pari o inferiore al 92 %.

<Utilizzando lo strumento Toxinometro MT-6500>

- 1) Preparare lo strumento Toxinometro MT-6500 seguendo le procedure indicate nel manuale d'istruzioni. Verificare che la temperatura sia 37 °C (+/-0,5).
- 2) Inserire parte del cilindro dell'apposito stappa provette nel reagente LAL e ruotare lentamente a 30–40 °C in modo da rimuovere il tappo di alluminio e quello di gomma. Coprire la provetta LAL con un tappo di alluminio fornito a parte.
- 3) Verificare l'identità del lotto tra i dati di calibrazione ed il LAL.
- 4) Aggiungere 0,2 ml di campione pretrattato a R2 (reagente LAL per 0,2 ml). Mescolare bene con vortex per alcuni secondi fino a quando il reagente LAL non è completamente dissolto e poi inserirlo nello strumento Toxinometro MT-6500. Il LAL deve essere inserito nella posizione che presenta una luce LED verde lampeggiante.
- 5) La misurazione ha inizio automaticamente dopo l'inserimento del LAL e la luce LED verde passa da lampeggiante a fissa.
- 6) La luce LED verde si spegne alla fine dell'analisi.
- 7) Il risultato del (1→3)-β-D-glucano si ottiene grazie al tg del campione e ai valori di calibrazione allegati. Nel caso in cui si ottengano valori molto elevati di BDG (>600 pg/ml), si richiede di diluire il campione pretrattato. (Riferirsi alle istruzioni d'uso del prodotto "β-Glucan Sample Diluent"). La concentrazione del (1→3)-β-D-Glucano presente nel campione pretrattato e diluito deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.
- 8) Il controllo negativo e positivo devono essere confermate le seguenti condizioni:
Controllo negativo: tg di 90 min o superiore. Il tampone di dissoluzione per il controllo LAL va utilizzato come controllo negativo senza pretrattamento del campione.
Controllo positivo: il valore ottenuto, calcolato a partire dai dati di calibrazione, deve cadere nel range di ±20 % della concentrazione nota. Il controllo positivo devono essere trattati come il campione.
 Il controllo LAL va utilizzato come controllo positivo. Il tampone di diluizione per il controllo LAL va utilizzato come controllo negativo.

Si sospetta contaminazione dei materiali o durante la procedura quando il tempo di gelificazione del controllo negativo è meno di 90 min o il controllo positivo corrisponde al 20 % o più della concentrazione nota. In questi casi è necessario rifare l'analisi.

Valori Attesi

Valore cutoff: 7 pg/ml (come (1→3)-β-D-glucano).⁽¹⁾⁽¹³⁾

Performance

Sensibilità

- a) Quando viene testata acqua (0 pg/ml di (1→3)-β-D-glucano) il tempo di gelificazione è di 90 minuti o superiore.
b) Quando viene testata la soluzione standard ((1→3)-β-D-glucano 3,3 pg/ml) il tempo di gelificazione è tra i 25 e 55 minuti.

Specificità

Quando viene testato un campione di concentrazione nota, il valore ottenuto rientra in un range di ±20 % della concentrazione nota.

Precisione

[Precisione intra-saggio]

Di seguito si indicano i dati di valutazione intra-saggio. I risultati del CV % per ciascun campione di plasma analizzato con 21 ripetizioni varia da 3,4 % a 4,7 %.

Campione n.	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Media (pg/ml)	11,8	78,4	373,8
SD (pg/ml)	0,40	2,83	17,55
CV (%)	3,4	3,6	4,7

[Precisione totale]

Di seguito vengono indicati i dati rappresentativi per la precisione. Tutti i dati sono stati raccolti in accordo con CLSI protocollo EP5-A3.

Campione n.	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Media totale (pg/ml)	10,6	74,1	392,2
Precisione totale ST (pg/ml)	0,7	4,9	25,6
Precisione totale CV (%)	6,4	6,6	6,5

Accuratezza

L'accuratezza del metodo è stata valutata con uno studio di recupero.

Campione di plasma 1

Aggiunti (pg/mL)	0,0	75,0	150,0	300,0
Misurati	10,0	73,2	134,3	275,9
	10,4	73,2	134,3	250,5
	10,2	67,4	134,3	290,0
Media (pg/mL)	10,2	71,3	134,3	272,1
Ottenuti (pg/mL)		61,1	124,1	261,9
Recupero %	-----	81,5 %	82,7 %	87,3 %

Campione di plasma 2

Aggiunti (pg/mL)	0,0	75,0	150,0	300,0
Misurati	73,2	144,6	239,0	378,2
	73,2	139,6	228,2	400,2
	71,2	139,3	228,2	378,2
Media (pg/mL)	72,5	141,1	231,8	385,5
Ottenuti (pg/mL)		68,6	158,3	313,0
Recupero %	-----	91,5 %	106,2 %	104,3 %

Campione di plasma 3

Aggiunti (pg/mL)	0,0	75,0	150,0	300,0
Misurati	191,3	250,5	357,8	478,1
	191,3	250,5	338,9	478,1
	183,5	250,5	338,9	478,1
Media (pg/mL)	188,7	250,5	345,2	478,1
Ottenuti (pg/mL)		61,8	156,5	289,4
Recupero %	-----	82,4 %	104,3 %	96,5 %

I dati di recupero del (1→3)-β-D-glucano corrispondono a 81,5 % – 106,2 % rispetto ai range di concentrazione indicati nella tabella sopra riportata.

Linearità

Nella valutazione, le concentrazioni di (1→3)-β-D-glucano nel campione fino a 600 pg/ml sono lineari.

Nel caso in cui si ottengano valori molto elevati di BDG (>600 pg/ml), si richiede di diluire il campione pretrattato. (Riferirsi alle istruzioni d'uso del prodotto "β-Glucan Sample Diluent").

Correlazione ⁽⁸⁾⁽¹³⁾

		Fungitell		Totale
		Positivo	Negativo	
WAKO siero	Positivo	127	3	130
	Negativo	10	182	192
Totale		137	185	322
Concordanza dei positivi:		92,7 %		
Concordanza dei negativi:		98,4 %		
Concordanza totale:		96,0 %		

		Fungitell		Totale
		Positivo	Negativo	
WAKO plasma	Positivo	90	4	94
	Negativo	1	64	65
Totale		91	68	159
Concordanza dei positivi:		98,9 %		
Concordanza dei negativi:		94,1 %		
Concordanza totale:		96,9 %		

Sostanze interferenti

Campioni emolizzati e bilirubina non hanno influenze significative nel saggio.

Avvertimenti e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- L'uso e l'applicazione di questi test è riservato all'uso professionale. Si chiede di far riferimento ai regolamenti e alle legislazioni nazionali e locali.
- Non per uso interno animale o umano.
- Se il reagente viene a contatto con bocca, occhi o pelle, lavare immediatamente con molta acqua. Consultare un medico se necessario.
- Nel caso in cui vengano utilizzate pipette di vetro, non pipettare con la bocca e utilizzare una pipetta di sicurezza.
- Prestare attenzione a non ferirsi mentre si rimuovono i tappi di alluminio dalla fiala.
- R2: i reagenti LAL contengono materiali di origine umana. I materiali sono stati testati e sono risultati negativi per HBsAg, anticorpi anti-HIV-1/HIV-2 ed anticorpi anti-HCV. Dal momento che non è possibile escludere con certezza il rischio di infezione, si raccomanda di maneggiare con cura i prodotti come potenzialmente pericolosi e con le stesse precauzioni con cui si maneggia un campione di siero di un paziente.
- Smaltire i reagenti secondo le normative locali o nazionali.

β-Glucan Test R1 contiene composti classificati in base di regolamento (CE) n. 1272/2008!

Avvertenza:

attenzione

Pittogrammi:



Indicazioni di pericolo: H317..... Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza: P280..... Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P303+P361+P353..... IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle (o fare una doccia).
P308+P313..... IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

Componenti pericolosi per l'etichettatura:..... 2-metilisotiazol-3(2H)-one

<Precauzioni per la procedura>

Raccolta e manipolazione dei campioni:

- Si raccomanda l'eparina (soluzione iniettabile di eparina sodica della farmacopea giapponese) come anticoagulante per l'analisi di (1→3)-β-D-glucano nel plasma. Per la separazione del plasma mediante centrifugazione, questa dovrebbe essere fatta a 2-10 °C, 3000 rpm con rotore con raggio 10 cm e 40 sec, o centrifugando per 10 minuti a 150 g*.
*rotore 1200 rpm con raggio 10 cm
- Le provette sottovuoto utilizzate per i campioni di sangue non devono essere contaminate da (1→3)-β-D-glucano. I prelievi di sangue devono essere fatti in modo da evitare contaminazioni con (1→3)-β-D-glucano.
- Si consiglia di eseguire il pretrattamento subito dopo il prelievo. Tenere il campione lontano da fonti di contaminazione da (1→3)-β-D-glucano. Congelare a -80 °C quando non è possibile eseguire l'analisi in tempi brevi. Il campione può essere conservato fino ad un mese.
- Utilizzare solo i tempi e le temperature indicati nella metodica.
- Questo test può subire contaminazioni dai materiali utilizzati o altre circostanze. Durante il saggio devono essere utilizzati i materiali adeguati e prestare attenzione durante le fasi di lavorazione.
- Le provette sottovuoto per il prelievo di sangue, i puntali o gli occhiali di protezione dovrebbero essere utilizzati dopo conferma di non essere contaminati da (1→3)-β-D-glucano.
- Prestare attenzione durante la procedura per evitare contaminazioni da (1→3)-β-D-glucano.
- Le fiale sono chiuse sotto pressione ridotta. Prestare attenzione all'apertura per evitare di disperdere la polvere liofilizzata.
- Non toccare la base della fiala del LAL in quanto è la parte interessata dalla lettura fotografica del Toxinometro.
- Prima dell'inserimento nel Toxinometro, controllare che non ci siano bolle nella provetta. Se ci sono bolle, rimuoverle scuotendo la base della provetta.
- Nel caso in cui la misurazione esca dal range di valutazione, si consiglia di diluire con β-Glucan Sample Diluent il campione pretrattato e moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.
- Nel caso in cui il campione pretrattato sia particolarmente torbido, centrifugarlo a 3000 rpm, 20 minuti ed usare il surnatante come campione pretrattato.

<Precauzioni del saggio>

- Conservare i reagenti alle condizioni indicate. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sulle singole confezioni.
- Non utilizzare reagenti congelati per errore. Questi reagenti possono fornire risultati errati.
- Dopo l'apertura, si raccomanda di utilizzare i reagenti immediatamente e di non conservarli.
- Non utilizzare i contenitori o altri materiali presenti nel kit per altri scopi.
- Non utilizzare i reagenti in altre intente che non siano quelle indicate in questo documento
- Non utilizzare i reagenti in altre procedure che non siano quelle indicate in questo documento. Non possono essere garantite performance se i reagenti sono utilizzati in altre procedure.
- Utilizzare lo strumento in condizioni appropriate seguendo il manuale d'uso. Consultare il produttore per ulteriori dettagli.

<Precauzioni per determinazione/risultati e diagnosi>

- Alcuni campioni possono presentare torbidità non specifica durante il saggio e dare risultati errati. Nel caso in cui si tratti di risultati sospetti, si chiede di confermare la presenza/assenza di una torbidità non specifica con l'andamento del tempo di reazione o il test di diluizione.
- Campioni provenienti da pazienti in dialisi trattati con membrana di dialisi in cellulosa o pazienti trattati con farmaci a base di (1→3)-β-D-glucano da funghi come lentinano o similari possono dare risultati falsi positivi.
- Concentrazioni di (1→3)-β-D-glucano possono aumentare in modo transiente dopo un'operazione chirurgica.
- Alti livelli di endotossina possono fornire risultati falsi positivi.
- I risultati devono essere valutati insieme alle indicazioni dello specialista e ai sintomi.

<Precauzioni per smaltimento>

- Quando vengono eliminati i reagenti, smaltirli secondo le normative locali o nazionali.
- Tutti i dispositivi inclusi i reagenti e i flaconi che vengono in contatto con i campioni devono essere considerati come potenzialmente infetti.

Controllo della qualità

Ai laboratori clinici è consigliato svolgere un programma per il controllo della qualità.

Si raccomanda di eseguire le analisi utilizzando il kit di controllo LAL di FUJIFILM WAKO per ciascun test al fine di monitorare le prestazioni della procedura. I valori ottenuti per il controllo rientrano nel ±20 % rispetto ai valori assegnati.

Condizioni di conservazione

Prodotto	Condizioni di conservazione
β-Glucano Test R1: Pretreatment Solution (Soluzione di pretrattamento)	Conservare a 2-10 °C
β-Glucano Test R2: LAL Reagent	Conservare a 2-10 °C

Riferimenti

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 ameobocytes. FEBS Lett., 129, 318-321 (1981).
4. Nakamura, T., Morita, T., et al.: Japanese Society for Bacteriologies, 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).

Informazioni per gli ordini

Codice n.	Prodotto	Confezione
993-04201	β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution	50 x 0,9 ml
997-04101	β-Glucan Test R2: LAL Reagent	50 x per 0,2 ml
995-04401	LAL Control R1: LAL Control (liofilizzato) R2: Control dissolution buffer (Tampone di dissoluzione del controllo)	10 x per 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 unità
995-05001	BC Tip EXT S	100 puntali
991-05101	BC Tip 1000-R	100 puntali
993-04701	Toxinometer MT-6500	1 unità
999-04801	MT-6500 Extension Module	1 unità
993-03601	Thermostation TS 70/16	1 unità
998-22211	Cooling Station	1 unità