

Utilisation prévue

Le dosage β-Glucan Test est un test *in vitro* destiné à la détermination quantitative du β-glucane dans le sérum ou le plasma.

Résumé et explication du test

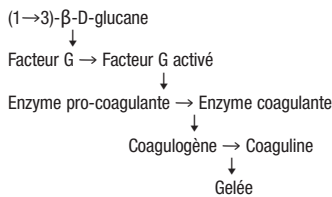
Le (1→3)-β-D-glucane est un composant de paroi cellulaire fongique. Le test β-Glucan Test est un marqueur diagnostique utile dans le cas de nombreuses infections fongiques invasives.

Principe du test

Afin d'éliminer toute activité endotoxine, l'échantillon est ajouté à la solution de prétraitement et chauffé.

Lorsqu'un échantillon prétraité contenant du (1→3)-β-D-glucane est mélangé avec le réactif LAL Reagent, la réaction en cascade ci-dessous est déclenchée par le facteur G. Cette réaction induit une turbidité ainsi qu'une gélification.

La quantité de (1→3)-β-D-glucane présente dans l'échantillon peut être calculée à partir de la relation proportionnelle entre la quantité de (1→3)-β-D-glucane et le temps de gélification nécessaire afin d'atteindre une turbidité définie avec une quantité connue de (1→3)-β-D-glucane.



Réactifs et contenu

R1 : Pretreatment Solution

R2 : LAL Reagent (pour 0,2 ml)
(lysate d'améboocyte de Limule, albumine (humaine))

Carte d'étalonnage, ouvre-capuchon

Préparation du réactif

R1 : utiliser la solution de prétraitement Pretreatment Solution telle que fournie. Après ouverture du réactif, il est recommandé de l'utiliser immédiatement et de ne pas le conserver.

R2 : utiliser le réactif LAL Reagent tel que fourni. Après ouverture du réactif, il est recommandé de l'utiliser immédiatement et de ne pas le conserver.

Prélèvement et préparation des échantillons

Utiliser du sérum ou du plasma en tant qu'échantillon.

Tester les échantillons immédiatement après le prélèvement.

Il est recommandé d'effectuer le prélèvement conformément à la réglementation locale et nationale. Dans la mesure où tous les échantillons sont potentiellement infectieux, ils doivent être manipulés conformément à la réglementation locale et nationale relative à la manipulation de ce matériel.

La stabilité du (1→3)-β-D-glucane est résumée ci-dessous (données internes). La stabilité du (1→3)-β-D-glucane dans l'échantillon dépend des caractéristiques de l'échantillon.

Température de conservation	Stabilité du (1→3)-β-D-glucane dans un échantillon
-80 °C	Stable jusqu'à 30 jours
4 °C	Diminution d'environ 6 % après 3 jours
25 °C	Diminution d'environ 20 % après 2 jours

Réalisation du test

1) Étalonage

Voir la fiche de données d'étalonnage concernant le temps de gélification et la concentration comme accessoire dans le test β-Glucan Test avec le réactif R2 : LAL Reagent.

Traçabilité : la concentration de β-glucane a été déterminée en mesurant un calibre avec le réactif du test β-Glucan Test et l'étalon FUJIFILM Wako 1st β-Glucan standard. L'étalon FUJIFILM Wako 1st β-Glucan standard a été préparé à l'aide de lentinine.

2) Matériel/équipement requis, disponibles séparément

- Toxinometer MT-6500.
- Thermostatisation TS-70/16
- Capuchon en aluminium
- β-Glucan Sample Diluent (disponible séparément)
- LAL Control (disponible séparément)
- Embout : BC Tip EXT / BC Tip 1000-R
- Cooling Station

3) Matériel/équipements requis, non fournis

- Mélangeur à vortex
- Pipette
- Glacière

4) Procédure de mesure

<Saisie des données d'étalonnage>

Saisir les données d'étalonnage en lisant le code QR imprimé sur la carte d'étalonnage avec le lecteur connecté à l'instrument Toxinometer MT-6500.

En cas d'erreur relative au code QR, les données d'étalonnage imprimées sur la carte d'étalonnage peuvent être saisies manuellement. Consulter le manuel de l'instrument.

<Prétraitement de l'échantillon>

Ajouter 0,1 ml de plasma hépariné ou de sérum à 0,9 ml de solution de prétraitement R1: Pretreatment Solution et mélanger soigneusement. Chauffer à 70 °C pendant exactement 10 minutes, puis refroidir à l'aide d'un bain de glace immédiatement pendant au moins 3 minutes.

<Procédure opératoire normalisée>

	Échantillon (sérum ou plasma)	Contrôle positif (LAL control)	Contrôle négatif (tampon de dissolution du LAL control)
R2:	Échantillon	Contrôle positif	Contrôle négatif
LAL-Reagent (pour 0,2 ml)	prétraité 0,2 ml	prétraité 0,2 ml	0,2 ml*

Temps de mesure de la gélification (Tg) par Toxinometer MT-6500
(37 °C, longueur d'onde moyenne de 660 nm)

*Ne pas utiliser la solution de prétraitement R1 : Pretreatment Solution pour le contrôle négatif.

Définition du temps de gélification (Tg) : durée de réaction requise jusqu'à atteindre une valeur inférieure ou égale à 92 % du ratio de transmittance.

<Utilisation de l'instrument Toxinometer MT-6500>

- 1) Préparer l'instrument Toxinometer MT-6500 conformément à la procédure décrite dans le manuel d'utilisation. Vérifier que la température est de 37 °C (±0,5).
- 2) Utiliser l'ouvre-capuchon pour ouvrir le réactif R2: LAL Reagent en le faisant tourner doucement d'un angle de 30 à 40° afin de retirer le capuchon en aluminium et le capuchon en caoutchouc. Refermer le tube LAL avec le capuchon en aluminium.
- 3) Confirmer l'identité du lot entre les données d'étalonnage et le LAL.
- 4) Ajouter 0,2 ml d'échantillon prétraité à R2: LAL Reagent (pour 0,2 ml) et mélanger à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant quelques secondes après avoir confirmé visuellement que le LAL est totalement dissous. Insérer le tube de LAL dans les puits de mesure de l'instrument Toxinometer MT-6500. Le LAL doit être inséré à l'emplacement où la LED verte clignote.
- 5) La mesure démarre automatiquement après avoir inséré le tube LAL. La LED verte cesse de clignoter pour afficher une lumière verte constante.
- 6) La LED verte s'éteint une fois le test terminé.
- 7) Le résultat du test du (1→3)-β-D-glucane est obtenu à partir du temps de gélification (Tg) de l'échantillon et des données d'étalonnage associées. En cas de valeur de BDG très élevée (> 600 pg/ml), diluer l'échantillon prétraité. (Veuillez vous reporter à la notice « β-Glucan Sample Diluent »). La concentration en (1→3)-β-D-glucane de l'échantillon prétraité et dilué doit être multipliée par le facteur de dilution.
- 8) Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent confirmer les conditions suivantes :
Contrôle négatif : le Tg est d'au moins 90 minutes. Le tampon de dissolution du LAL Control doit être utilisé comme contrôle négatif sans prétraitement de l'échantillon.
Contrôle positif : la valeur calculée à partir des données d'étalonnage est comprise dans la plage de ±20 % de la concentration connue. Le contrôle positif doit être prétraité comme l'échantillon.
 Le LAL control doit être utilisé comme contrôle positif.

La contamination de l'équipement ou lors de la réalisation du test peut être supposée lorsque le temps de gélification du contrôle négatif est inférieur à 90 minutes ou que le résultat du contrôle positif est supérieur ou égal à 20 % de la concentration connue. Le cas échéant, un nouveau test est nécessaire.

Valeurs attendues

Valeur seuil : 7 pg/ml (comme (1→3)-β-D-glucane)⁽¹⁾⁽¹³⁾

Caractéristiques de performance

Sensibilité

- a) Lors du test de l'eau (0 pg/ml de (1→3)-β-D-glucane), le temps de gélification est supérieur ou égal à 90 minutes.
b) Lors du test de la solution étalon ((1→3)-β-D-glucane 3,3 pg/ml), le temps de gélification est compris entre 25 et 55 minutes.

Spécificité

Lors du test d'un échantillon de concentration connue, la valeur de test est comprise dans la plage de ±20 % de la concentration connue.

Précision

[Précision au sein d'une série]

Ci-dessous figurent les données représentatives de la précision au sein d'une série. Les résultats du CV % pour chaque échantillon de plasma mesuré 21 fois étaient compris entre 3,4 % et 4,7 %.

N° de l'échantillon	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
Moyenne (pg/ml)	11,8	78,4	373,8
ET (pg/ml)	0,40	2,83	17,55
CV (%)	3,4	3,6	4,7

[Précision globale]

Ci-dessous figurent les données représentatives de la précision globale. Toutes les données ont été collectées conformément au protocole EP5-A3 du CLSI.

N° de l'échantillon	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
Moyenne globale (pg/ml)	10,6	74,1	392,2
ET de la précision globale (pg/ml)	0,7	4,9	25,6
CV de la précision globale (%)	6,4	6,6	6,5

Exactitude

L'exactitude de cette méthode a été déterminée par une étude de récupération.

Échantillon de plasma 1

Ajouté (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Mesuré	10,0	73,2	134,3	275,9
	10,4	73,2	134,3	250,5
	10,2	67,4	134,3	290,0
Moyenne (pg/ml)	10,2	71,3	134,3	272,1
Obtenu (pg/ml)		61,1	124,1	261,9
% de récupération	-----	81,5 %	82,7 %	87,3 %

Échantillon de plasma 2

Ajouté (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Mesuré	73,2	144,6	239,0	378,2
	73,2	139,6	228,2	400,2
	71,2	139,3	228,2	378,2
Moyenne (pg/ml)	72,5	141,1	231,8	385,5
Obtenu (pg/ml)		68,6	159,3	313,0
% de récupération	-----	91,5 %	106,2 %	104,3 %

Échantillon de plasma 3

Ajouté (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Mesuré	191,3	250,5	357,8	478,1
	191,3	250,5	338,9	478,1
	183,5	250,5	338,9	478,1
Moyenne (pg/ml)	188,7	250,5	345,2	478,1
Obtenu (pg/ml)		61,8	156,5	289,4
% de récupération	-----	82,4 %	104,3 %	96,5 %

Le taux de récupération du (1→3)-β-D-glucane est de 81,5 % à 106,2 % dans les plages de concentration indiquées dans le tableau ci-dessus.

Linéarité

Les concentrations de (1→3)-β-D-glucane dans les échantillons allant jusqu'à 600 pg/ml étaient linéaires au cours de l'évaluation. En cas de valeur de BDG trop élevée (> 600 pg/ml), diluer l'échantillon prétraité. Veuillez vous reporter à la notice « β-Glucan Sample Diluent ».

Corrélation⁽⁹⁾⁽¹³⁾

	Fungitell		Total
	Positif	Négatif	
Sérum WAKO			
	Positif	127	3
	Négatif	10	182
Total		137	185

Pourcentage de concordance positive = 92,7 %
= 98,4 %
Concordance globale = 96,0 %

	Fungitell		Total
	Positif	Négatif	
Plasma WAKO			
	Positif	90	4
	Négatif	1	64
Total		91	68

Pourcentage de concordance positive = 98,9 %
= 94,1 %
Pourcentage de = 96,9 %

Substances

La bilirubine et l'hémolyse n'ont pas eu d'influence significative sur le test.

Avertissements et précautions

- Pour diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation et l'application de ce test sont réservées aux professionnels. Veuillez vous reporter à la réglementation et à la législation nationales et locales en vigueur.
- Non destiné à un usage interne chez l'homme ou l'animal.
- En cas de contact du réactif avec la bouche, les yeux ou la peau, rincer immédiatement à grande eau. Consulter un médecin si nécessaire.
- En cas d'utilisation d'une pipette en verre, ne pas effectuer de prélèvement avec la bouche, mais utiliser une propipette.
- Éviter toute coupure avec le capuchon en aluminium lors de son retrait du flacon.
- R2 : LAL Reagent contient du matériel d'origine humaine. Le matériel a fait l'objet de tests de l'AgHBs, des anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et de l'anticorps anti-VHC dont les résultats étaient négatifs. Dans la mesure où le risque d'infection ne peut être exclu avec certitude, les produits doivent être manipulés comme du matériel présentant un risque biologique, tout comme le sérum des patients.
- Éliminer les réactifs conformément à la réglementation locale ou nationale.

β-Glucan Test R1 contient parmi ses constituants une substance classée comme suit selon règlement (CE) n° 1272/2008 !

Mention d'avertissement : attention

Pictogrammes :



Mentions de danger : H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

Conseils de prudence : P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P303+P361+P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau (ou se doucher).
P308+P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

Composants dangereux pour l'étiquetage : 2-méthylisothiazol-3(2H)-one

<Précautions relatives à la réalisation du test>

- L'héparine est l'anticoagulant recommandé pour effectuer le test du (1→3)-β-D-glucane dans le plasma. La séparation du plasma par centrifugation doit être effectuée entre 2 et 10 °C, pendant 40 s à 3 000 tr/min avec un rayon de rotor de 10 cm, ou centrifuger pendant 10 minutes à 150 g*.
- *1 200 tr/min avec un rayon de rotor de 10 cm.
- Le tube de prélèvement de sang sous vide ne doit pas être contaminé par du (1→3)-β-D-glucane. Le prélèvement de sang doit être effectué avec précaution afin d'éviter la contamination par (1→3)-β-D-glucane.
- Effectuer le prétraitement immédiatement après le prélèvement. Conserver l'échantillon dans un récipient non contaminé par (1→3)-β-D-glucane et le congeler à -80 °C afin de le conserver si l'analyse n'est pas possible immédiatement. La période de conservation ne doit pas dépasser un mois.
- Observer la température de réaction et le temps de réaction indiqués.
- Ce test est susceptible d'être influencé par un équipement utilisé ou une autre source de contamination en cas d'erreur de manipulation. Un équipement adéquat doit être utilisé tout en veillant à éviter toute contamination au cours de la réalisation du test.
- Les tubes de prélèvement de sang sous vides du commerce et des embouts ou un équipement de transfert en verre doivent être utilisés après avoir exclu toute contamination par (1→3)-β-D-glucane.
- Veiller à éviter toute contamination par (1→3)-β-D-glucane au cours de la réalisation du test.
- Le flacon est scellé à faible pression. Retirer doucement le bouchon afin d'éviter de répandre la poudre en dehors du flacon.
- Ne pas toucher ni salir le fond du tube LAL, car cette partie est utilisée pour la mesure photométrique avec l'instrument Toxinometer.
- Avant de mettre le tube LAL en place dans l'instrument Toxinometer, vérifier que le mélange ne contient pas de bulles. En cas de présence de bulles, les retirer en tapotant le tube avec l'index.
- Si la valeur mesurée dépasse la plage mesurable, diluer le mélange prétraité avec le β-Glucan Sample Diluent, répéter le test et multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.
- Si le mélange présente une turbidité significative, centrifuger le mélange prétraité à 3.000 tr/min pendant 20 minutes et utiliser le surnageant comme échantillon prétraité.

<Précautions relatives au test>

- Conserver les réactifs conformément aux conditions indiquées. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption figurant sur chaque étiquette de récipient de réactif.
- Ne pas utiliser des réactifs ayant été congelés par erreur. Ces réactifs peuvent être à l'origine de résultats erronés.
- Après ouverture des réactifs, il est recommandé de les utiliser immédiatement et de ne pas les conserver.
- Ne pas utiliser les récipients ou les autres matériels du kit à toute autre fin que celles prévues.
- Ne pas utiliser les réactifs décrits ci-dessus à toute autre fin que celles décrites dans cette notice.
- Ne pas utiliser les réactifs décrits ci-dessus dans le cadre de toute autre procédure que celle décrite dans cette notice. En cas d'utilisation des réactifs dans le cadre d'autres procédures, la performance ne peut être garantie.
- Utiliser les instruments conformément aux manuels d'utilisation dans des conditions appropriées. Consulter le manuel de l'instrument pour plus d'informations.

<Précautions relatives à la détermination/aux résultats et au diagnostic>

- Certains échantillons présentent une turbidité non spécifique au cours du test, pouvant donner des résultats erronés. En cas de résultat suspect, confirmer la présence ou l'absence de turbidité non spécifique par le temps de réaction ou un test de dilution.
- Les échantillons provenant de patients dialysés ayant été traités par membranes de dialyse à base de cellulose ou de patients ayant été traités par médicaments à base de (1→3)-β-D-glucane issus de champignons, tels que le lentinane ou d'autres substances similaires, sont susceptibles de donner des résultats faux positifs.
- La concentration de (1→3)-β-D-glucane peut augmenter de façon temporaire après une intervention chirurgicale.
- Un taux d'endotoxine élevé peut donner des erreurs positives.
- Les résultats doivent être utilisés en corrélation avec l'examen médical et les symptômes du patient.

<Précautions d'élimination>

- Éliminer les réactifs conformément à la réglementation locale ou nationale.
- Tous les dispositifs, y compris les réactifs et les flacons de réactif, qui entrent en contact avec les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Contrôle qualité

Un programme de contrôle qualité est recommandé pour les laboratoires cliniques. L'analyse à l'aide du kit FUJIFILM Wako LAL Control avec chaque test est recommandée afin de surveiller la performance du test. Les valeurs obtenues pour le contrôle doivent être de ±20 % des valeurs attribuées.

Conditions de conservation

Produit	Conditions de conservation
β-Glucan Test R2 : LAL Reagent	Conserver entre 2 et 10 °C
β-Glucan Test R1 : Pretreatment Solution	Conserver entre 2 et 10 °C

Références

- 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. and 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 Bacteriology, 38, 781-803, (1983) (in Japanese).
- 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).
- Harada, K., Tsuchiya, M., et al. : 6th Endotoxin Symposium Proceedings, 7-12 (1993) (in Japanese).
- Harada, K., Tsuchiya, M., et al. : 40th Japanese Society for Symposium of Toxins Proceedings, 155-158 (1993) (in Japanese).
- Données internes
- 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).

Références à commander

Code	Produit	Conditionnement
993-04201	β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution	50 x 0,9 ml
997-04101	β-Glucan Test R2: LAL Reagent	50 x pour 0,2 ml
995-04401	LAL Control R1: LAL Control (lyophilisé) R2: Control dissolution buffer	10 x pour 0,5 ml 10 x 2 ml
999-04301	β-Glucan Sample Diluent	10 x 0,9 ml
995-04901	Capuchon en aluminium	10 x 10 unités
995-05001	BC Tip EXT	100 embouts
991-05101	BC Tip 1000-R	100 embouts
993-04701	Toxinometer MT-6500	1 unité
999-04801	MT-6500 Extension Module	1 unité
993-03601	Thermostation TS 70/16	1 unité
998-22211	Cooling Station	1 unité