

#### Uso indicado

El β-Glucan Test es un ensayo *in vitro* para la cuantificación de β-glucano en el suero o plasma.

#### Resumen y explicación de la prueba

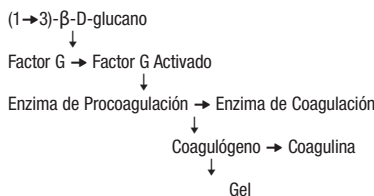
(1→3)-β-D-glucano es un componente de la pared celular fúngica. El β-Glucan Test es un marcador diagnóstico útil para numerosas infecciones fúngicas invasoras.

#### Principio del método

Con el fin de suprimir la actividad de las endotoxinas, la muestra es añadida a la solución de pre-tratamiento y calentada.

Cuando una muestra pre-tratada que contiene (1→3)-β-D-glucano se mezcla con el reactivo LAL, el factor G desencadena la reacción en cascada mostrada a continuación. Esta reacción provoca turbidez y gelificación.

La cantidad de (1→3)-β-D-glucano en la muestra puede calcularse en base a la relación proporcional entre la cantidad de (1→3)-β-D-glucano y el tiempo de gelificación necesario para alcanzar una turbidez determinada con una cantidad específica de (1→3)-β-D-glucano.



#### Reactivos y contenidos

R1: Pretreatment Solution (solución de pre-tratamiento)

R2: LAL Reagent (reactivo LAL) para 0,2 mL  
(Lisado de amebocitos de *Limulus*, Albúmina (humana))

Tarjeta de calibración, abridor de tapones

#### Preparación de reactivos

R1: Utilizar la solución de pre-tratamiento suministrada. Tras abrir el reactivo, se recomienda usarlo inmediatamente y no almacenarlo.

R2: Utilizar el reactivo LAL suministrado. Tras abrir el reactivo, se recomienda usarlo inmediatamente y no almacenarlo.

#### Obtención y preparación de muestras

Utilizar suero o plasma como muestra.

Llevar a cabo la prueba inmediatamente tras obtener la muestra.

Se recomienda efectuar la obtención de muestras de acuerdo con los reglamentos locales y nacionales. Debido a que todas las muestras son potencialmente infecciosas, éstas deberán ser manipuladas de acuerdo con los reglamentos locales y nacionales relativos al tratamiento seguro de tales sustancias.

La estabilidad del (1→3)-β-D-glucano se resume a continuación (datos propios). La estabilidad del (1→3)-β-D-glucano en la muestra depende de las características de esta última.

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad de (1→3)-β-D-glucano en una muestra
-80 °C	Estable hasta 30 días
4 °C	Reducción aproximada del 6 % después de 3 días
25 °C	Reducción aproximada del 20 % después de 2 días

#### Procedimiento de ensayo

#### 1) Calibración

Consulte el tiempo de gelificación y la concentración en la ficha técnica de calibración incluida como complemento a la prueba de β-glucano R2 ( Reactivo LAL).

**Trazabilidad:** La concentración de β-glucano se determinó midiendo un calibrador con el reactivo de la prueba de β-glucano y el estándar de β-glucano FUJIFILM Wako 1<sup>er</sup>. El estándar de β-glucano FUJIFILM Wako 1<sup>er</sup> se preparó usando lentianina.

#### 2) Material / equipamiento necesario, disponible por separado:

- Toxinometer MT-6500
- Thermostation (Módulo térmico) TS-70/16
- Aluminum Cap (Tapón de aluminio)
- β-Glucan Sample Diluent (diluyente de muestras de β-glucano) disponible por separado
- LAL Control (control de LAL) disponible por separado
- Punta: BC Tip EXT / BC Tip 1000-R
- Cooling Station

#### 3) Material / equipamiento necesario, no suministrado:

- Agitador vórtex
- Pipeta
- Caja de hielo

#### 4) Procedimiento de medición

<Entrada de datos de calibración>

Introduzca los datos de calibración leyendo el código QR impreso en la tarjeta de calibración con el lector conectado al Toxinometer MT-6500.

En caso de que el código QR no funcione, los datos de calibración impresos en la tarjeta podrán introducirse manualmente. Consulte el manual del instrumento.

<Pre-tratamiento de la muestra>

Añadir 0,1 mL de plasma heparinizado o suero a 0,9 mL de R1 (solución de pre-tratamiento) y mezclar bien. Calentar a 70 °C exactamente 10 minutos y a continuación enfriar con hielo inmediatamente a menos 3 min.

<Procedimiento normal de actuación>

	Muestra (suero o plasma)	Control positivo (control LAL)	Control negativo (tampón de disolución del control LAL)
R2: reactivo LAL (para 0,2 mL)	Muestra pretratada (para 0,2 mL)	Control positivo pretratado (0,2 mL)	Control negativo* (0,2 mL)

Tiempo de medición de la gelificación (Tg) por el Toxinometer MT-6500 (37 °C, longitud de onda media de 660 nm)

\*No usar R1 (solución de pre-tratamiento) para el control negativo

Definición del tiempo de gelificación (Tg): tiempo de reacción requerido hasta alcanzar un porcentaje de transmitancia del 92 % o menor.

<Uso del Toxinometer MT-6500>

- 1) Preparar el Toxinometer MT-6500 del modo indicado en el manual de instrucciones. Comprobar que la temperatura es de 37 °C (± 0,5).
- 2) Utilizar el abridor de tapones para abrir R2 (reactivo LAL) girándolo lentamente a un ángulo de 30–40 grados con el fin de quitar el tapón de aluminio y el de goma. Tapar el tubo LAL con el tapón de aluminio.
- 3) Confirmar la coincidencia de lote entre los datos de calibración y LAL.
- 4) Añadir 0,2 mL de muestra pre-tratada a R2 (reactivo LAL para 0,2 mL) y mezclar unos segundos con el agitador vórtex hasta constatar que el LAL se haya disuelto por completo. Insertar el tubo LAL en las cavidades de medición del Toxinometer MT-6500. El LAL debe insertarse en la posición en la que la luz del LED verde parpadee.
- 5) La medición empieza automáticamente al insertar el tubo LAL. El LED verde dejará de parpadear y será luz verde fija.
- 6) El LED verde se apagará tras completar el ensayo.
- 7) El resultado del ensayo de (1→3)-β-D-glucano se obtiene a partir del tiempo de gelificación (Tg) de la prueba y los datos de calibración adjuntos. En caso de obtener un valor muy alto de BDG (>600 pg/mL), diluir la muestra pre-tratada. (Consulte el prospecto del "β-Glucan Sample Diluent". La concentración de (1→3)-β-D-glucano en la muestra pre-tratada del diluyente deberá multiplicarse por el factor de dilución.
- 8) Los controles negativo y positivo deberán ser tratados como la muestra y deberán confirmar las condiciones siguientes:

**Control negativo:** Tg es de 90 minutos o más. El tampón de disolución para el control LAL debe usarse como control negativo sin pretratamiento de la muestra.

**Control positivo:** el valor calculado a partir de los datos de calibración está en el rango de ± 20 % de la concentración conocida. El control positivo debería ser pre-tratado como una muestra. Como control positivo se recomienda usar el control LAL.

Puede asumirse contaminación en el material o en la realización de la prueba si el tiempo de gelificación es inferior a 90 minutos para el control negativo o el control positivo arroja un resultado de un 20 % o más de la concentración conocida. En tales casos deberá repetirse el análisis.

#### Valores esperados

Punto de corte: 7 pg/mL (como (1→3)-β-D-glucano)<sup>(1)(13)</sup>

#### Características de rendimiento

##### Sensibilidad

- a) Cuando la prueba se efectúa con agua (0 pg/mL de (1→3)-β-D-glucano), el tiempo de gelificación es de 90 minutos o más.  
b) Cuando la prueba se efectúa con solución estándar (3,3 pg/mL de (1→3)-β-D-glucano), el tiempo de gelificación va de 25 a 55 minutos.

##### Especificidad

Cuando la prueba se efectúa con una muestra de concentración conocida, el valor de ensayo está en el rango de ± 20 % de dicha concentración.

##### Precisión

###### [Intra-ensayo]

A continuación, se muestran datos representativos de la precisión intra-ensayo. El coeficiente de variación (CV) de cada muestra de plasma medido en 21 réplicas varió del 3,4 % al 4,7 %.

N.º de muestra	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 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

###### [Precisión total]

A continuación, se muestran datos representativos de los datos de precisión totales. Todos los datos fueron obtenidos conforme al protocolo EP5-A3 del CLSI.

N.º de muestra	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Media total (pg/mL)	10,6	74,1	392,2
Precisión total SD (pg/mL)	0,7	4,9	25,6
Precisión total CV (%)	6,4	6,6	6,5

##### Exactitud

La exactitud de este método fue determinada mediante un estudio de recuperación.

###### Muestra de plasma 1

Añadido (pg/mL)	0,0	75,0	150,0	300,0
Medido	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
Obtenida (pg/mL)		61,1	124,1	261,9
Recuperación %	-----	81,5 %	82,7 %	87,3 %

###### Muestra de plasma 2

Añadido (pg/mL)	0,0	75,0	150,0	300,0
Medido	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
Obtenida (pg/mL)		68,6	159,3	313,0
Recuperación %	-----	91,5 %	106,2 %	104,3 %

###### Muestra de plasma 3

Añadido (pg/mL)	0,0	75,0	150,0	300,0
Medido	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
Obtenida (pg/mL)		61,8	156,5	289,4
Recuperación %	-----	82,4 %	104,3 %	96,5 %

La tasa de recuperación de (1→3)-β-D-glucano es del 81,5 % al 106,2 % en los rangos de concentración mostrados en la tabla de arriba.

#### Linealidad

La evaluación de las concentraciones de (1→3)-β-D-glucano en muestras de hasta 600 pg/mL arrojó un resultado lineal. En caso de obtener un valor muy alto de BDG (>600 pg/mL), se debe diluir la muestra pre-tratada. Consulte el prospecto del "β-Glucan Sample Diluent."

#### Correlación<sup>(8)(13)</sup>

	Fungitell		Total
	Positivo	Negativo	
WAKO Serum	127	3	130
	10	182	192
Total	137	185	322

Porcentaje de concordancia positiva = 92,7 %  
Porcentaje de concordancia negativa = 98,4 %  
Concordancia total = 96,0 %

	Fungitell		Total
	Positivo	Negativo	
WAKO Plasma	90	4	94
	1	64	65
Total	91	68	159

Porcentaje de concordancia positiva = 98,9 %  
Porcentaje de concordancia negativa = 94,1 %  
Concordancia total = 96,9 %

#### Sustancias interferentes

La bilirrubina y la hemólisis no influyen significativamente en el ensayo.

#### Advertencias y precauciones

- Para el uso en el diagnóstico *in vitro*.
- La utilización y la aplicación de esta prueba están reservadas exclusivamente a profesionales. Observe los reglamentos y la legislación local y nacional.
- No se autoriza el uso interno en animales o seres humanos.
- Si los reactivos entran en contacto con la boca, los ojos o la piel, lavar inmediatamente con agua abundante. Consultar a un médico si es necesario.
- En caso de utilizar una pipeta de vidrio, no pipetear con la boca, sino utilizar una pipeta segura.
- Procure no cortarse al quitar el Aluminio Cap (tapón de aluminio) del vial.
- El R2 (Reactivo LAL) contiene sustancias de origen humano. Estas sustancias se han comprobado y han dado negativo en pruebas de HBsAg, anticuerpos anti-HIV-1/HIV-2 y anticuerpo anti-HCV. Ya que el riesgo de infección no puede excluirse con total seguridad, los productos deberán tratarse como sustancias biológicas potencialmente peligrosas al igual que los sueros sanguíneos de pacientes.
- Elimine los reactivos según los reglamentos locales o nacionales.

β-Glucan Test R1 contiene componentes clasificados como sigue de acuerdo con arreglo al Reglamento (CE) n° 1272/2008!

**Palabra de advertencia:** *attenzione*

#### Pictogramas:



**Indicaciones de peligro:** H317 ..... Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

**Consejos de prudencia:** P280 ..... Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P303+P361+P353 ..... EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar la piel con agua (o ducharse).

P308+P313 ..... EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

**Componentes peligrosos para el etiquetado:** ..... 2-metilisotiazol-3(2H)-ona

#### <Precauciones relativas al procedimiento>

- Se recomienda el uso de heparina como anticoagulante en el ensayo de (1→3)-β-D-glucano en plasma. La separación de plasma por centrifugado deberá hacerse a una temperatura de entre 2 y 10 °C durante 40 segundos a 3.000 rpm con un radio de rotor de 10 cm, o centrifugando durante 10 minutos a 150 g\*. \*1.200 rpm en un rotor con radio de 10 cm.
- El tubo de vacío para la extracción de sangre no deberá contaminarse con (1→3)-β-D-glucano. La extracción de sangre deberá hacerse cuidadosamente para evitar la contaminación con (1→3)-β-D-glucano.
- Se aconseja efectuar el pre-tratamiento inmediatamente tras la extracción. Guarde la muestra en un envase no contaminado de (1→3)-β-D-glucano y congélela a -80 °C para su almacenamiento si no es posible el análisis inmediato. El periodo de almacenamiento no deberá exceder un mes.
- Observar la temperatura y el tiempo de reacción especificados.
- Este ensayo puede verse afectado por la contaminación del equipamiento utilizado o aquella derivada de errores de manipulación. Deberá utilizarse el equipamiento adecuado y procurar evitar la contaminación durante todo el procedimiento.
- Los tubos de vacío para la extracción de sangre comercialmente disponibles y las puntas o el equipamiento de vidrio para la dispensación se deberán utilizar sólo tras haber excluido la posibilidad de contaminación con (1→3)-β-D-glucano.
- Asegúrese de evitar la contaminación con (1→3)-β-D-glucano durante el procedimiento de ensayo.
- El frasco está sellado a presión reducida. Quitar el tapón lentamente para evitar que el polvo escape del frasco.
- No tocar ni manchar la parte inferior del tubo LAL, ya que esta parte es utilizada por el Toxinometer para la medición fotométrica.
- Antes de introducir el tubo LAL en el Toxinometer, comprobar la ausencia de burbujas en la mezcla. En caso de que existan burbujas, eliminarlas golpeando ligeramente la parte inferior del tubo.
- Si el valor medido excede el rango de medición, diluir la mezcla pre-tratada con diluyentes de muestras de β-glucano, repetir el ensayo y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.
- Si la mezcla muestra turbidez significativa, centrifugar la mezcla pre-tratada a 3.000 rpm durante 20 minutos y utilizar el sobrenadante como muestra pre-tratada.

#### <Precauciones relativas a los ensayos>

- Almacenar los reactivos a las condiciones especificadas. No usar los reactivos tras superarse la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de su envase.
- No utilizar reactivos que hayan sido congelados por error. Tales reactivos podrían dar resultados falsos.
- Tras abrir los reactivos, se recomienda usarlos inmediatamente y no almacenarlos.
- No usar los envases u otros materiales incluidos en el paquete para otros propósitos.
- No utilizar los reactivos anteriormente mencionados para ningún otro propósito distinto al aquí descrito.
- No usar los reactivos anteriormente mencionados en procedimientos distintos a los que aquí se describen. La efectividad de los reactivos no podrá garantizarse si éstos se utilizan en otros procedimientos.
- Manejar los instrumentos a las condiciones apropiadas y conforme a los manuales de uso respectivos. Para más información, consulte el manual de los instrumentos.

#### <Precaución relativa a la cuantificación/los resultados y el diagnóstico>

- Algunas muestras presentan turbidez no específica durante el ensayo, lo cual podría arrojar resultados erróneos. Si un resultado levanta sospechas, confirmar la presencia o ausencia de turbidez no específica en el desarrollo del tiempo de reacción o mediante una prueba de dilución.
- Las muestras de pacientes de diálisis tratados con membranas de diálisis con base de celulosa o de pacientes tratados con medicamentos procedentes de hongos basados en (1→3)-β-D-glucano –tales como lentinan o sustancias similares– podrían dar resultados falsos positivos.
- La concentración de (1→3)-β-D-glucano puede aumentar transitoriamente tras una intervención quirúrgica.
- Unos niveles elevado-s de endotoxina también podrían generar falsos positivos.
- Los resultados deberán evaluarse junto con la valoración médica y los síntomas del paciente.

#### <Precauciones relativas a la eliminación>

- La eliminación de reactivos deberá realizarse conforme a los reglamentos locales o nacionales.
- Todos los componentes – incluidos los reactivos y sus botellas – que entren en contacto con las muestras deberán ser considerados potencialmente infecciosos.

#### Control de calidad

Se recomienda que los laboratorios clínicos dispongan de un programa de control de calidad. Con el fin de controlar la efectividad del procedimiento, se recomienda el análisis con los controles LAL de FUJIFILM Wako. Los valores de control obtenidos deberán hallarse dentro de un intervalo de ± 20 % de los valores asignados.

#### Condiciones de almacenamiento

Producto	Condiciones de almacenamiento
β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution (solución de pre-tratamiento)	Almacenar entre 2–10 °C
β-Glucan Test R2: LAL Reagent	Almacenar entre 2–10 °C

#### Referencias

- 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) (en japonés).
- 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) (en japonés).
- Harada K., Tsuchiya M. et al.: 40th Japanese Society Symposium of Toxins Proceedings, 155-158 (1993) (en japonés).
- Datos internos
- 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).

#### Información de pedido

Código	Producto	Paquete
993-04201	β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution	50 x 0,9 mL
997-04101	β-Glucan Test R2: LAL Reagent	50 x para 0,2 mL
995-04401	LAL Control R1: LAL Control (liofilizado) R2: Control dissolution buffer (tampón de disolución de control)	10 x para 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 unidades
995-05001	BC Tip EXT	100 puntas
991-05101	BC Tip 1000-R	100 puntas
993-04701	Toxinometer MT-6500	1 unidad
999-04801	MT-6500 Extension Module	1 unidad
993-03601	Thermostat TS 70/16	1 unidad
998-22211	Cooling Station	1 unidad