

Osnovna upotreba

Beta-glukan test je *in vitro* test za kvantitativno određivanje beta-glukana u serumu ili plazmi.

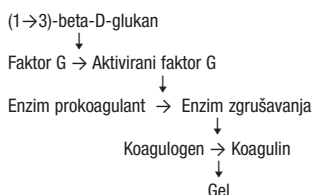
Rezime i objašnjenje testa

(1→3)-beta-D-glukan je komponenta zida gljivične ćelije. Beta-glukan test je koristan dijagnostički marker za mnoge invazivne gljivične infekcije.

Načelo metode

U cilju suzbijanja aktivnosti endotoksina, uzorak se dodaje rastvoru za predtretman i zagreva. Kada se prethodno tretirani uzorak koji sadrži (1→3)-beta-D-glukan pomeša sa LAL reagensom, kaskadna reakcija ispod se aktivira faktorom G. Ova reakcija dovodi do zamućenja uz geliranje.

Količina (1→3)-beta-D-glukana u uzorku može se izračunati na osnovu proporcionalnog odnosa između količine (1→3)-beta-D-glukana i vremena geliranja koje je potrebno da se postigne definisana mutnoća sa poznatom količinom (1→3)-beta-D-glukana.

**Reagensi i sadržaj**

R1: Rastvor za predtretman

R2: LAL reagens (0,2 ml)
(limulus amebocyte lizat, albumin (ljudski)

kartica za kalibraciju, otvarač poklopca

Priprema reagensa

R1: Koristite rastvor za predtretman u isporučenom stanju. Nakon otvaranja reagensa, preporučuje se da ga odmah iskoristite, a ne da ga čuvate.

R2: Koristite LAL reagens u isporučenom stanju. Nakon otvaranja reagensa, preporučuje se da ga odmah iskoristite, a ne da ga čuvate.

Prikupljanje uzoraka i priprema

Koristite serum ili plazmu kao uzorak.

Testirajte uzorke neposredno nakon prikupljanja.

Preporučuje se da se prikupljanje uzoraka obavlja u skladu sa lokalnim i nacionalnim propisima. Budući da su svi uzorci potencijalno infektivni, sa njima treba postupati u skladu sa lokalnim ili nacionalnim propisima koji se odnose na sigurno rukovanje takvim materijalima.

Stabilnost (1→3)-beta-D-glukana je sumirana u nastavku (sopstveni podaci). Stabilnost (1→3)-beta-D-glukana u uzorku zavisi od karakteristika uzorka.

Temperatura skladištenja	Stabilnost (1→3)-beta-D-glukana u uzorku
-80 °C	Stabilan do 30 dana
4 °C	Smanjenje za oko 6 % nakon 3 dana
25 °C	Smanjenje za oko 20 % nakon 2 dana

Postupak ispitivanja**1) Kalibracija**

Pogledajte kalibracijski list za vreme geliranja i koncentracije kao dodatnu opremu u beta-glukan testu R2: LAL reagens.

Praćenje: Koncentracija beta-glukana je određena merenjem kalibratora sa reagensom beta-glukan testa i 1. beta-glukan standardom FUJIFILM Wako. Wako 1. beta-glukan standard pripremljen je koristeći lentinan.

2) Materijali/potrebna oprema, dostupni zasebno

- Toxinometer MT-6500 (Toksiniometar MT-6500)
- Thermostation TS-70/16 (Termostanica TS-70/16)
- Aluminum Cap (Aluminijumski poklopac)
- β-Glucan Sample Diluent (separately available) (Razređivač uzorka beta-glukana (zasebno dostupan))
- LAL Control (separately available) (LAL kontrola (zasebno dostupna))
- Tip: BC Tip EXT / BC Tip 1000-R (BC nastavci EXT / BC nastavci 1000R)
- Cooling Station (Blok za hlađenje)

3) Materijali/potrebna oprema, nije isporučeno

- Vortex mikser
- Pipeta
- Posuda za hlađenje

4) Postupak merenja**<Ulazni podaci o kalibraciji>**

Unesite podatke o kalibraciji očitavajući QR kod odštampan na kalibracijskoj kartici sa čitačem povezanim sa toksimetrom MT-6500.

U slučaju neuspešnog QR koda, podaci za kalibraciju odštampani na kalibracijskoj kartici mogu se ručno uneti. Pogledajte uputstvo instrumenta.

<Predtretman za uzorak>

Dodajte 0,1 ml heparinizirane plazme ili seruma u 0,9 ml R1: rastvora za predtretman i dobro promešajte. Zagrejte na 70 °C u trajanju od tačno 10 minuta, a zatim hladite ledom odmah, najmanje 3 min.

<Standardni postupak procedure>

	Uzorak (serum ili plazma)	Pozitivna kontrola (LAL kontrola)	Negativna kontrola (pufer za razređivanje za LAL kontrolu)
R2:	Predtretirani	Predtretirana	
LAL-reagens (za 0,2 ml)	uzorak 0,2 ml	pozitivna kontrola 0,2 ml	Negativna kontrola 0,2 ml*

Merite vreme geliranja (Tg) toksimetrom MT-6500 (37 °C, srednja talasna dužina 660 nm).

*Nemojte koristiti R1: rastvor za predtretman za negativnu kontrolu

Definicija vremena za geliranje (Tg): potrebno vreme reakcije dok se ne postigne 92 % ili manji stepen prozirnosti.

<Korišćenje toksimetra MT-6500>

- 1) Pripremite toksimetar MT-6500 prema proceduri rada iz uputstva za upotrebu. Proverite da li je temperatura 37 °C (±0,5).
- 2) Koristite otvarač poklopca za otvaranje R2: LAL reagensa uvrtnjem polako pod uglom od 30-40 stepeni, kako biste uklonili aluminijumski poklopac i gumeni čep. Pokrijte LAL epruvetu aluminijumskim poklopcem.
- 3) Potvrdite identitet serije između podataka kalibracije i LAL.
- 4) Dodajte 0,2 ml predtretiranog uzorka R2: LAL reagens (0,2 ml) i mešajte ga vortex mikserom nekoliko sekundi nakon što ste vizuelno potvrdili da se LAL potpuno rastvorio. Ubacite LAL epruvetu u otvore za merenje toksimetra MT-6500. LAL treba ubaciti na poziciji gde zelena LED lampica treperi.
- 5) Merenje se automatski pokreće nakon ubacivanja LAL epruvete. Zelena LED lampica prestaje da treperi i pokazuje konstantno zeleno svetlo.
- 6) Zelena LED lampica se isključuje nakon završetka testa.
- 7) Rezultat (1→3)-beta-D-glukan testa se dobija iz vremena geliranja (Tg) uzorka i priloženih podataka kalibracije. U slučaju vrlo visoke BDG vrednosti (>600 pg/ml), razredite predtretirani uzorak. (Molimo pogledajte uputstvo u pakovanju „Razređivač uzorka beta-glukana“). (1→3)-beta-D-glukan koncentraciju predtretiranog i razređenog uzorka treba pomnožiti sa faktorom razređenja.
- 8) Negativna kontrola i pozitivna kontrola treba da potvrde sledeće uslove:
Negativna kontrola: Tg je 90 minuta i duže. Pufer za razređivanje LAL kontrole treba koristiti kao negativnu kontrolu bez predtretmana uzorka.
Pozitivna kontrola: izračunata vrednost iz podataka kalibracije je u rasponu od ±20 % od poznate koncentracije. Pozitivnu kontrolu treba predtretirati kao uzorak.

LAL kontrolu treba koristiti kao pozitivnu kontrolu.

Kontaminacija opreme ili prilikom rada može se pretpostaviti kada je vreme geliranja negativnih kontrola manje od 90 minuta ili je pozitivan rezultat kontrole 20% i viši od poznate koncentracije. U takvim slučajevima, potrebno je ponovno ispitivanje.

Očekivane vrednosti

Izolovane vrednosti: 7 pg/ml (kao (1→3)-beta-D-glukan)⁽¹⁾⁽¹³⁾

Karakteristike performansi

Osetljivost

- a) Kada se voda (0 pg/ml (1→3)-beta-D-glukan) testira, vreme geliranja je 90 minuta i duže.
b) Kada se standardni rastvor ((1→3)-beta-D-glukan 3,3 pg/ml) analizira, vreme za geliranje kreće se od 25 do 55 minuta.

Specifičnost

Kada se analizira uzorak poznate koncentracije, vrednost testa je u opsegu ±20 % od poznate koncentracije.

Preciznost

[U okviru proverene preciznosti]

U nastavku su reprezentativni podaci u okviru proverene preciznosti. Rezultati CV % za svaki uzorak plazme meren u 21 ponavljanju bili su u rasponu od 3,4 % do 4,7 %.

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

[Ukupna preciznost]

U nastavku su reprezentativni podaci ukupnih podataka preciznosti. Svi podaci prikupljeni su u skladu sa CLSI protokolom EP5-A3.

Uzorak br.	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
Ukupna srednja (pg/ml)	10,6	74,1	392,2
Ukupna preciznost SD (pg/ml)	0,7	4,9	25,6
Ukupna preciznost CV (%)	6,4	6,6	6,5

Tačnost

Tačnost ove metode je određena prema studiji za oporavak.

Plazma uzorak 1

Dodato (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Merenje	10,0	73,2	134,3	275,9
	10,4	73,2	134,3	250,5
	10,2	67,4	134,3	290,0
	srednje (pg/ml)	10,2	71,3	134,3
Dobijeno (pg/ml)		61,1	124,1	261,9
Oporavak %	-----	81,5 %	82,7 %	87,3 %

Plazma uzorak 2

Dodato (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Merenje	73,2	144,6	239,0	378,2
	73,2	139,6	228,2	400,2
	71,2	139,3	228,2	378,2
	srednje (pg/ml)	72,5	141,1	231,8
Dobijeno (pg/ml)		68,6	159,3	313,0
Oporavak %	-----	91,5 %	106,2 %	104,3 %

Plazma uzorak 3

Dodato (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Merenje	191,3	250,5	357,8	478,1
	191,3	250,5	338,9	478,1
	183,5	250,5	338,9	478,1
	srednje (pg/ml)	188,7	250,5	345,2
Dobijeno (pg/ml)		61,8	156,5	289,4
Oporavak %	-----	82,4 %	104,3 %	96,5 %

Stopa oporavka (1→3)-beta-D-glukana je 81,5 %-106,2 % u opsezima koncentracije prikazanim u gornjoj tabeli.

Linearnost

Koncentracije (1→3)-beta-D-glukana u uzorcima do 600 pg/ml bile su linearne u evaluaciji. U slučaju vrlo visoke BDG vrednosti (>600 pg/ml), razredite predtretirani uzorak. Molimo pogledajte uputstvo u pakovanju „Razredivač uzorka beta-glukana“.

Revizija april 2021.

Korelacija⁽⁸⁾⁽¹³⁾

		Fungitell		Ukupno
		Pozitivno	Negativno	
WAKO serum	Pozitivno	127	3	130
	Negativno	10	182	192
Ukupno		137	185	322

Procenat pozitivnog slaganja = 92,7 %
Procenat negativnog slaganja = 98,4 %
Ukupno slaganje = 96,0 %

		Fungitell		Ukupno
		Pozitivno	Negativno	
WAKO plazma	Pozitivno	90	4	94
	Negativno	1	64	65
Ukupno		91	68	159

Procenat pozitivnog slaganja = 98,9 %
Procenat negativnog slaganja = 94,1 %
Ukupno slaganje = 96,9 %

Interferentne supstance

Bilirubina i hemolize nemaju značajan uticaj na test.

Upozorenja i mere opreza

- Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
- Upotreba i primena ovog testa je rezervisana samo za profesionalnu upotrebu. Molimo vas da pročitate odgovarajuće nacionalne i lokalne propise i zakone.
- Ne sme se koristiti za unutrašnju upotrebu kod ljudi ili životinja.
- Ako reagensi dođu u kontakt sa ustima, očima, ili kožom, odmah ih isperite velikom količinom vode. Obratite se lekaru, ako je potrebno.
- U slučaju korišćenja staklene pipete, ne pipetirajte ustima, već koristite sigurnosnu pipetu.
- Pazite da se ne isečete aluminijumskim poklopcem kada ga budete uklanjali sa bočice.
- R2: LAL reagens sadrži materijale ljudskog porekla. Materijali su testirani i negativni su na HBsAg, anti-HIV-1/HIV-2 antitela i anti-HCV antitela. Budući da se rizik od infekcije ne može isključiti sa sigurnošću, proizvodi se moraju tretirati kao potencijalni biološki otrov, poput seruma pacijenata.
- Odložite reagense u skladu sa lokalnim ili nacionalnim propisima.
- **R1 reagens u testu za β-glukan sadrži – 2-metilizotiazol-3(2H)-on CAS 2682-20-4**

<Mere opreza za postupak>

- Kao antikoagulans, heparin se preporučuje u slučaju (1→3)-beta-D-glukan testa u plazmi. Za odvajanje plazme centrifugiranjem, to treba učiniti između 2-10 °C, 40 sek. pri brzini od 3.000 rpm sa radijusom rotora od 10 cm, ili centrifugiranjem 10 minuta sa 150 g*.
* 1.200 rpm sa radijusom rotora od 10 cm.
- Vakumirana epruveta za prikupljanje krvi ne sme biti kontaminirana (1→3)-beta-D-glukanom. Prikupljanje krvi treba vršiti pažljivo da bi se izbegla kontaminacija (1→3)-beta-D-glukanom.
- Predtretiranje treba uraditi odmah nakon prikupljanja. Držite uzorak u posudi bez kontaminacije (1→3)-beta-D-glukanom i zamrznete na -80 °C da biste ga sačuvali, ako analiza nije odmah moguća. Period čuvanja je mesec dana
- Obratite pažnju na određene temperature reakcije i vreme reakcije.
- Ovaj test može biti kontaminiran opremom koja se koristi ili drugim kontaminacijama nastalim pogrešnim rukovanjem. Odgovarajuću opremu treba koristiti i treba posvetiti pažnju da bi se izbegla kontaminacija za vreme procesa.
- Komercijalne vakumirane epruvete za prikupljanje krvi i vrhove ili staklenu opremu za doziranje treba koristiti nakon isključivanja kontaminacije (1→3)-beta-D-glukanom.
- Pazite da izbegnete kontaminaciju (1→3)-beta-D-glukana tokom vršenja testa.
- Bočica se zatvara smanjenim pritiskom. Polako uklonite stoper da biste izbegli da oduvate prah iz bočice.
- Ne dodirujte niti vlažite dno LAL epruvete, jer se taj deo koristi za fotometrijsko merenje toksimetrom.
- Pre stavljanja LAL epruvete u toksimetar, uverite se da nema mehurića u mešavini. U slučaju da ima mehurića, uklonite mehuriće tako što ćete blago pomeriti dno epruvete.
- Ako izmerena vrednost premašuje merljive opsege, razredite prethodno tretiranu mešavinu sa razredivačem uzorka beta-glukana, ponovite test i pomnožite dobijeni rezultat sa faktorom razređenja.
- Ako mešavina pokazuje značajnu mutnoću, centrifugirajte predtretiranu mešavinu brzinom od 3.000 rpm 20 minuta i koristite supernatant kao predtretirani uzorak.

Proizveden od strane

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

Ovlašćeni evropski predstavnik

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstr. 12, 41468 Neuss, Nemačka

Tel.: +49-2131-311-272 · Fax: +49-2131-311-110

wako-chemicals.de

Wako

<Mere opreza za testove>

- Čuvajte reagense pod određenim uslovima. Nemojte koristiti reagense nakon isteka roka naznačenog na etiketi svakog reagensa.
- Nemojte koristiti reagense koji su zamrznuti greškom. Takvi reagensi mogu dati lažne rezultate.
- Nakon otvaranja reagensa, preporučuje se da ih odmah iskoristite i nemojte ih čuvati.
- Nemojte koristiti posudice i druge materijale iz pakovanja u bilo koje druge svrhe.
- Nemojte koristiti gore opisane reagense u bilo koju drugu svrhu osim u one koje su ovde opisane.
- Nemojte koristiti gore opisane reagense u bilo kom drugom postupku osim onom koji je opisan u ovom dokumentu. Učinak se ne može garantovati ako se reagensi koriste u drugim postupcima.
- Koristite instrumente u skladu sa uputstvima za upotrebu i pod odgovarajućim uslovima. Konsultujte uputstvo instrumenta za detalje.

<Predostrožnosti za određivanje/rezultate i dijagnoza>

- Neki uzorci mogu pokazati nespecifičnu mutnoću tokom testa, koja može dati pogrešne rezultate. Potvrdite prisustvo ili odsustvo nespecifične mutnoće vremenom reakcije ili testom razređivanja, ako rezultat daje povoda za sumnju.
- Uzorci pacijenata na dijalizi koji su tretirani membranama za dijalizu na bazi celuloze ili pacijenata koji su tretirani lekovima baziranim na (1 → 3)-beta-D-glukanu iz gljiva, kao što su lentinan ili slične supstance, mogu dati lažno pozitivne rezultate.
- Koncentracija (1 → 3)-beta-D-glukana može se povećati kratkotrajno nakon operacije.
- Visok nivo endotoksina može dati pozitivne greške.
- Rezultate treba koristiti u vezi sa medicinskom procenom i simptomima pacijenata.

<Mere opreza pri odlaganju>

- Odlaganje reagensa mora biti učinjeno u skladu sa lokalnim ili nacionalnim propisima.
- Sve uređaje, uključujući reagense i bočice reagenasa, koji dođu u kontakt sa uzorcima, treba smatrati potencijalno zaraznim.

Kontrola kvaliteta

Program kontrole kvaliteta se preporučuje za kliničke laboratorije. Korišćenje FUJIFILM Wako LAL kontrolnog seta sa svakim testom se preporučuje za praćenje učinka postupka. Dobijene vrednosti za kontrolu treba / mora da budu u okviru $\pm 20\%$ od dodeljenih vrednosti.

Uslovi za čuvanje

Proizvod	Uslovi za čuvanje
beta-glukan test R2: LAL reagens	Čuvajte na temperaturi između 2-10 °C
beta-glukan test R1: rastvor za predtretman	Čuvajte na temperaturi između 2-10 °C

Reference

- 1) Mori, T., Ikemoto, H., et al.: Evaluacija plazme (1 → 3)-beta-D-glukan merenja kinetičkim turbidimetrijskim-limulus testom, za kliničku dijagnozu mikotičnih infekcija, 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. i Iwanaga, S.: Novi (1 → 3)-beta-D-glukan put koagulacije pronađen u limulus amebocitima. FEBS Lett., 129, 318-321 (1981).
- 4) Nakamura, T., Morita, T., et al.: Japansko društvo bakteriologa, 38, 781-803, (1983) (na japanskom).
- 5) Stone, B. A. i Clarke, A. E.: Hemija i biologija (1 → 3)-beta-D-glukana, 11-12, La Trobe University Press, Victoria, Australia (1992).
- 6) Harada, K., Tsuchiya, M., et al.: 6. Zbornika radova endotoksina, 7-12 (1993) (na japanskom).
- 7) Harada, K., Tsuchiya, M., et al.: 40. Japansko društvo za Zbornik radova toksina, 155-158 (1993) (na japanskom).
- 8) Interni podaci
- 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).

Informacije o naručivanju

Šifra	Proizvod	Pakovanje
993-04201	β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution (beta-glukan test R1: rastvor za predtretman)	50 x 0,9 ml
997-04101	β-Glucan Test R2: LAL Reagent (beta-glukan test R2: LAL reagens)	50 x za 0,2 ml
995-04401	LAL Control (LAL kontrola) R1: LAL Control (lyophilized) (R1: LAL kontrola (liofilizirana)) R2: Control dissolution buffer (R2: kontrolni pufer za razređivanje)	10 x za 0,5 ml 10 x 2 ml
999-04301	β-Glucan Sample Diluent (Razređivač uzorka beta-glukana)	10 x 0,9 ml
995-04901	Aluminum Cap (Aluminijumski poklopac)	10 x 10 jedinica
995-05001	BC Tip EXT (BC nastavci EXT)	100 vrhova
991-05101	BC Tip 1000-R (BC nastavci 1000-R)	100 vrhova
993-04701	Toxinometer MT-6500 (Toksimetar MT-6500)	1 jedinica
999-04801	MT-6500 Extension Module (MT-6500 ekstenzivni modul)	1 jedinica
993-03601	Thermostation TS 70/16 (Termostanica TS 70/16)	1 jedinica
998-22211	Cooling Station (Blok za hlađenje)	1 jedinica