

Určené použití

β-Glucan Test je test *in vitro* pro kvantitativní stanovení β-glukanu v séru nebo plazmě.

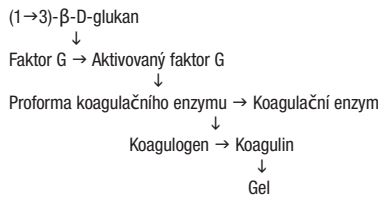
Shrnutí a vysvětlení testu

(1→3)-β-D-glukan je komponenta buněčných stěn hub. β-Glucan Test je užitečným diagnostickým markerem pro mnoho invazivních plísňových infekcí.

Princip metody

K potlačení endotoxinové aktivity je přidán vzorek do přípravného roztoku, který je zahříván. Když se upravený vzorek obsahující (1→3)-β-D-glukan smísí s činidlem LAL, faktor G způsobí vyvolání níže uvedené reakční kaskády. Tato reakce vyvolá turbiditu a gelatinizaci.

Množství (1→3)-β-D-glukanu ve vzorku lze vypočítat na základě poměrného vztahu mezi množstvím (1→3)-β-D-glukanu a dobou gelatinizace, jež je potřebná k dosažení stanovené turbidity ze známým množstvím (1→3)-β-D-glukanu.

**Činidla a obsah**

R1: Pretreatment Solution (Přípravný roztok)

R2: LAL Reagent (Činidlo LAL) (pro 0,2 ml) (Limulus Amebocyte Lysate), kalibrační karta albuminu (lidský), otevírací přípravek pertlí.

Příprava činidla

R1: Pretreatment Solution (Přípravný roztok) používejte tak, jak je dodáván. Po otevření je činidlo doporučeno okamžitě spotřebovat. Neskladujte jej.

R2: LAL Reagent (Činidlo LAL) používejte tak, jak je dodáváno. Po otevření je činidlo doporučeno okamžitě spotřebovat. Neskladujte jej.

Odběr a příprava vzorků

Jako vzorek použijte sérum nebo plazmu.

Vzorky otestujte ihned po odběru.

Doporučuje se, aby odběr vzorků byl prováděn v souladu s místními a národními předpisy. Vzhledem k tomu, že všechny vzorky jsou potenciálně infekční, je třeba s nimi zacházet v souladu s místními nebo národními předpisy, jež se týkají bezpečného zacházení s takovými materiály.

Stabilita (1→3)-β-D-glukanu je shrnuta níže (vlastní údaje). Stabilita (1→3)-β-D-glukanu ve vzorku závisí na charakteristikách vzorku.

Skladovací teplota	Stabilita (1→3)-β-D-glukanu ve vzorku
-80 °C	Stabilní po dobu až 30 dní
4 °C	Po 3 dnech přibližně 6% pokles
25 °C	Po 2 dnech přibližně 20% pokles

Postup testování**1) Kalibrace**

Dobu gelatinizace a koncentraci naleznete v kalibračním datovém listu, který je součástí příslušenství činidla β-Glucan Test R2: LAL Reagent.

Sledovatelnost: Koncentrace (1→3)-β-glukanu byla stanovena měřením kalibrátoru s činidlem β-Glucan Test a FUJIFILM Wako 1st β-Glucan Standard. FUJIFILM Wako 1st β-Glucan Standard byl připraven pomocí lentinanu.

2) Požadované materiály / přístroje, samostatně dostupné

- LIMUSAVE MT-7500
- TERMOSTANICE TS-70/20
- Toxinometer MT-6500
- TERMOSTANICE TS-70/16
- Hliníková pertle
- β-Glucan Sample Diluent (samostatně dostupné)
- LAL Control (samostatně dostupné)
- Špička: BC Tip EXT / BC Tip 1000-R
- Cooling Station

3) Požadované materiály / přístroje, nedodávané

- Vortexový mixér
- Pipeta
- Lednička

4) Postup měření

<Zadání kalibračních údajů>

Pomocí čtečky připojené k přístroji LIMUSAVE MT-7500 nebo Toxinometer MT-6500 zadejte kalibrační údaje načtením QR kódu vytištěného na kalibrační kartě.

V případě selhání QR kódu lze kalibrační údaje vytištěné na kalibrační kartě zadat ručně. Viz návod k obsluze přístroje.

<Příprava pro vzorek>

Přidejte 0,1 ml heparinovanou plazmu nebo séra do 0,9 ml roztoku R1: Pretreatment Solution a řádně promíchejte. Zahřívajte při teplotě 70 °C po dobu přesně 10 minut a neprodleně poté ochlazujte ledem po dobu nejméně 3 minut.

<Standardní provozní postup>

	Vzorek (sérum nebo plazma)	Positivní kontrola (LAL control)	Negativní kontrola (rozpuštěcí pufr LAL Control)
R2:	Upravený vzorek (na 0,2 ml)	Upravená pozitivní kontrola 0,2 ml	* Negativní kontrola 0,2 ml

Pomocí přístroje LIMUSAVE MT-7500, Toxinometer MT-6500 změřte dobu pro gelatinizaci (Tg). (37 °C, střední vlnová délka 660 nm)

*Pro negativní kontrolu nepoužívejte roztok R1: Pretreatment Solution

Definice doby pro gelatinizaci (Tg): požadovaný reakční čas, dokud se nedosáhne 92% nebo nižšího poměru transmitance

<Použití přístroje LIMUSAVE MT-7500 nebo Toxinometer MT-6500>

- Přístroj LIMUSAVE MT-7500 nebo Toxinometer MT-6500 připravte podle provozního postupu v návodu k obsluze. Zkontrolujte teplotu při 37 °C (± 0,5).
- K otevření R2: LAL Reagent použijte otevírací přípravek pertlí, kterým je třeba pomalu otáčet pod úhlem 30–40 stupňů, abyste odstranili hliníkovou pertlí a pryžové víčko. Opatřete lahvičku LAL hliníkovou pertlí.
- Zkontrolujte identitu šarže mezi kalibračními údaji a LAL.
- Přidejte 0,2 ml upraveného vzorku do činidla R2: LAL Reagent (pro 0,2 ml), vizuálně zkontrolujte, zda došlo k úplnému rozpuštění činidla LAL, a několik sekund promíchejte vortexovým mixérem. Vložte lahvičku LAL do měřících jamek přístroje Toxinometer MT-6500.
- Měření se spustí automaticky po vložení lahvičky LAL.
- Po dokončení testu zelená LED kontrolka zhasne.
- Výsledek testu (1→3)-β-D-glukanu je získán podle doby gelatinizace (Tg) vzorku a přiložených kalibračních údajů. V případě velmi vysoké hodnoty BDG (> 600 pg/ml) upravený vzorek naředte. (Přečtěte si prosím příbalovou informaci pro „β-Glucan Sample Diluent“.) Koncentraci (1→3)-β-D-glukanu upraveného a zředěného vzorku je třeba vynásobit faktorem ředění.
- Negativní kontrola a pozitivní kontrola musejí potvrdit následující podmínky:
Negativní kontrola: Negativní kontrola: Tg je 90 minut a více. Rozpuštěcí pufr pro LAL Control musí být použit jako negativní kontrola bez úpravy vzorku.
Positivní kontrola: vypočtená hodnota z kalibračních údajů je v rozmezí ± 20 % známé koncentrace. Pozitivní kontrola by měla být upravena jako vzorek. LAL Control by měl být použit jako pozitivní kontrola.

Pokud doba gelatinizace negativní kontroly je kratší než 90 minut nebo výsledek pozitivní kontroly je 20 % a vyšší než známá koncentrace, lze předpokládat kontaminaci na přístroji nebo za provozu. V takových případech je třeba provést opětovnou kontrolu.

Očekávané hodnoty

Prahová hodnota: 7 pg/ml (jako (1→3)-β-D-glukan)⁽¹⁾⁽¹³⁾

Výkonnostní charakteristiky**Čitlivost**

- Když je testována voda (0 pg/ml (1→3)-β-D-glukanu), doba gelatinizace je 90 minut a více.
- Když je testován standardní roztok (3,3 pg/ml (1→3)-β-D-glukanu), doba gelatinizace se pohybuje v rozmezí od 25 do 55 minut.

Specifičnost

Když je testován vzorek známé koncentrace, hodnota testu je v rozmezí ±20 % známé koncentrace.



Přesnost

[Přesnost v rámci jednoho pokusu]

Niže jsou uvedeny reprezentativní údaje o přesnosti v rámci jednoho pokusu. Výsledky CV% pro každý vzorek plazmy měřené ve 21 opakováních se pohybovaly v rozmezí od 1,5 do 4,7 %.

<LIMUSAVE MT-7500>

Č. vzorku	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Průměr (pg/ml)	8,5	64,3	516,7
SD (pg/ml)	0,13	1,71	13,69
CV (%)	1,5	2,7	2,6

<Toxinometer MT-6500>

Č. vzorku	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Průměr (pg/ml)	11,8	78,4	373,8
SD (pg/ml)	0,40	2,83	17,55
CV (%)	3,4	3,6	4,7

[Celková přesnost]

Niže jsou uvedeny reprezentativní údaje o celkové přesnosti. Všechny údaje byly shromážděny v souladu s protokolem CLSI EP5-A3.

<LIMUSAVE MT-7500>

Č. vzorku	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Celkový průměr (pg/ml)	10,2	67,4	447,0
Celková přesnost SD (pg/ml)	0,6	3,3	27,6
Celková přesnost CV (%)	5,4	4,9	6,2

<Toxinometer MT-6500>

Č. vzorku	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Celkový průměr (pg/ml)	10,6	74,1	392,2
Celková přesnost SD (pg/ml)	0,7	4,9	25,6
Celková přesnost CV (%)	6,4	6,6	6,5

Přesnost

Přesnost této metody byla určena studií regenerace. ermittelt.

<LIMUSAVE MT-7500>

Plazmový vzorek 1				
Přidán (pg/ml)	0,0	90,0	180,0	360,0
Měřený	9,6	97,5	182,5	329,8
	9,6	92,8	182,5	316,4
	9,5	90,6	182,5	316,4
průměr (pg/ml)	9,6	93,6	182,5	320,9
Získaný (pg/ml)		84,0	172,9	311,3
Regenerace %	-----	93,3 %	96,1 %	86,5 %

Plazmový vzorek 2

Přidán (pg/ml)	0,0	90,0	180,0	360,0
Měřený	73,2	176,7	250,1	410,4
	73,2	171,1	250,1	410,4
	71,2	171,1	250,1	429,8
průměr (pg/ml)	72,5	173,0	250,1	416,9
Získaný (pg/ml)		100,4	177,5	344,3
Regenerace %	-----	111,6 %	98,6 %	95,6 %

Plazmový vzorek 3

Přidán (pg/ml)	0,0	90,0	180,0	360,0
Měřený	188,7	291,8	375,2	521,6
	188,7	291,8	375,2	521,6
	182,5	291,8	375,2	521,6
průměr (pg/ml)	186,6	291,8	375,2	521,6
Získaný (pg/ml)		105,2	188,6	335,0
Regenerace %	-----	116,9 %	104,8 %	93,1 %

<Toxinometer MT-6500>

Plazmový vzorek 1				
Přidán (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Měřený	10,0	73,2	134,3	275,9
	10,4	73,2	134,3	250,5
	10,2	67,4	134,3	290,0
průměr (pg/ml)	10,2	71,3	134,3	272,1
Získaný (pg/ml)		61,1	124,1	261,9
Regenerace %	-----	81,5 %	82,7 %	87,3 %

Plazmový vzorek 2

Přidán (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Měřený	73,2	144,6	239,0	378,2
	73,2	139,6	228,2	400,2
	71,2	139,3	228,2	378,2
průměr (pg/ml)	72,5	141,1	231,8	385,5
Získaný (pg/ml)		68,6	159,3	313,0
Regenerace %	-----	91,5 %	106,2 %	104,3 %

Plazmový vzorek 3

Přidán (pg/ml)	0,0	75,0	150,0	300,0
Měřený	191,3	250,5	357,8	478,1
	191,3	250,5	338,9	478,1
	183,5	250,5	338,9	478,1
průměr (pg/ml)	188,7	250,5	345,2	478,1
Získaný (pg/ml)		61,8	156,5	289,4
Regenerace %	-----	82,4 %	104,3 %	96,5 %

Tempo regenerace (1→3)-β-D-glukanu je 81,5–116,9 % v rozmezích koncentrace, jež jsou uvedena v tabulce výše.



Linearita

Koncentrace (1→3)-β-D-glukanu ve vzorcích až do 600 pg/ml byly vyhodnoceny lineární. V případě velmi vysoké hodnoty BDG (> 600 pg/ml) upravený vzorek nařed'te. Přečtete si prosím příbalovou informaci pro „β-Glucan Sample Diluent“.

Korelace⁽⁹⁾⁽¹³⁾

		Fungitell		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
WAKO Serum	Pozitivní	127	3	130
	Negativní	10	182	192
	Celkem	137	185	322

Procento pozitivní shody = 92,7 %
Procento negativní shody = 98,4 %
Celková shoda = 96,0 %

		Fungitell		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
WAKO Plasma	Pozitivní	90	4	94
	Negativní	1	64	65
	Celkem	91	68	159

Procento pozitivní shody = 98,9 %
Procento negativní shody = 94,1 %
Celková shoda = 96,9 %

		Toxinometer MT-6500		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
LIMUSAVE MT-7500	Pozitivní	215	5	220
	Negativní	9	847	856
	Celkem	224	852	1076

Procento pozitivní shody = 96,0 %
Procento negativní shody = 99,4 %
Celková shoda = 98,7 %

Interferující látky

Bilirubin a hemolýza nemají na test významný vliv.

Varování a bezpečnostní opatření

- Pro diagnostické účely *in vitro*.
- Použití a aplikace tohoto testu jsou vyhrazeny pouze pro profesionální účely. Viz příslušné národní a místní předpisy a legislativa.
- Nesmí se používat vnitřně u lidí nebo zvířat.
- Pokud činidla přijdou do styku s ústy, očima nebo pokožkou, neprodleně je umyjte velkým množstvím vody. V případě potřeby se poraďte s lékařem.
- Pokud používáte skleněné pipety, nepipetujte ústy, ale použijte bezpečnostní pipetu.
- Při odstraňování hliníkové perle z lahvičky dávejte pozor, abyste se o ni nepořezali.
- R2: LAL Reagent obsahuje materiály lidského původu. Materiály byly testovány a shledány negativními pro HBsAg, protilátky anti-HIV-1 / HIV-2 a protilátku anti-HCV. Vzhledem k tomu, že nelze s jistotou vyloučit riziko infekce, s léčivými přípravky musí být zacházeno jako s potenciálně biologicky nebezpečnými látkami, jako jsou séra pacientů.
- Činidla likvidujte podle místních nebo národních předpisů.

Test β-glukanu R1 obsahuje následující složky klasifikované podle nařízení (ES) č. 1272/2008. Dbejte prosím bezpečnostního listu!

Signální slovo: varování

Výstražné symboly:



Standardní věty

o nebezpečnosti: H317..... Může vyvolat alergickou kožní reakci.

Pokyny pro bezpečné zacházení:

- P280..... Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ochranné brýle/ obličejový štít.
P303+P361+P353..... PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou (nebo osprchujte).
P308+P313..... PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Označení pro nebezpečné složky:..... methylisothiazolinone

Test β-glukanu R2 obsahuje následující složky klasifikované podle nařízení (ES) č. 1272/2008. Dbejte prosím bezpečnostního listu!

Doplňkový varování

před nebezpečím: EUH210..... Bezpečnostní list k dispozici na vyžádání.

<Opatření týkající se použití>

- V případě (1→3)-β-D-glukanového testu v plazmě je jako antikoagulační činidlo doporučen heparin. Oddělování plazmy je třeba provádět centrifugací v teplotním rozmezí 2–10 °C po dobu 40 sekund při 3 000 otáčkách za minutu s poloměrem rotoru 10 cm, respektive centrifugací po dobu 10 minut se 150 g* při *1.200 otáčkách za minutu s poloměrem rotoru 10 cm.
- Vakuová zkumavka pro odběr krve nesmí být kontaminována (1→3)-β-D-glukanem. Odběr krve je třeba provádět opatrně, aby se zabránilo kontaminaci (1→3)-β-D-glukanem.
- Neprodleně po odběru je třeba provést předběžnou úpravu. Pokud nelze provést okamžitou analýzu, vzorek uchovávejte v nádobce bez kontaminace (1→3)-β-D-glukanu a pro uskladnění zmrazte na -80 °C. Doba skladování musí být kratší než jeden měsíc.
- Dodržujte stanovenou reakční teplotu a reakční dobu.
- Tento test může být ovlivněn kontaminací z použitého zařízení nebo jinou kontaminací způsobenou chybnou manipulací. Je třeba používat správná zařízení a dbát pozornosti, aby během práce nedošlo ke kontaminaci.
- Po vyloučení kontaminace (1→3)-β-D-glukanem je třeba použít komerční vakuové zkumavky pro odběr krve a špičky nebo skleněná zařízení pro dávkování.
- Během testování dávejte pozor, aby nedošlo ke kontaminaci (1→3)-β-D-glukanem.
- Lahvička je zapertlována za sníženého tlaku. Pomalu odstraňte zátku, aby nedošlo k vyfouknutí prášku z lahvičky.
- Nedotýkejte se dna lahvičky LAL a dávejte pozor, abyste jej neznečistili, protože tato část se používá pro fotometrické měření pomocí přístroje Toxinometer.
- Před vložením lahvičky LAL do přístroje Toxinometer se přesvědčte, zda směs neobsahuje bubliny. Pokud jsou bubliny přítomny, odveďte je poklepáním na spodní část lahvičky.
- Pokud naměřená hodnota překročí měřitelný rozsah, nařed'te upravenou směs přípravkem β-Glucan Sample Diluent, zopakujte test a vynásobte získaný výsledek faktorem ředění.
- Pokud směs vykazuje významnou turbiditu, upravenou směs centrifugujte při otáčkách 3.000 ot/min po dobu 20 minut a jako upravený vzorek použijte supernatant.

<Opatření pro testy>

- Činidla uchovávejte za stanovených podmínek. Činidla nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku nádoby s činidlem.
- Činidlo, které bylo omylem zmrazeno, nepoužívejte. Taková činidla mohou ovlivnit pravdivost výsledků.
- Po otevření je činidla doporučeno okamžitě spotřebovat. Neskladujte je.
- Nádoby a jiné materiály v balení nepoužívejte pro žádné jiné účely.
- Výše popsaná činidla nepoužívejte pro jiné účely, než které jsou popsány v tomto dokumentu.
- Výše popsaná činidla nepoužívejte v žádných jiných postupech, než které jsou popsány v tomto dokumentu. Pokud jsou činidla použita v jiných postupech, nelze zajistit výkonost.
- Přístroje používejte podle návodu k obsluze a za vhodných podmínek. Podrobné informace naleznete v příručce k přístroji.



<Opatření týkající se stanovení, výsledků a diagnostiky>

- Některé vzorky při testu vykazují nespecifickou turbiditu, což může vést ke špatným výsledkům. Pokud výsledek vyvolává podezření, zkontrolujte přítomnost nebo nepřítomnost nespecifické turbidity pomocí časového průběhu reakce nebo testu ředění.
- Vzorky od pacientů, kteří jsou léčeni dialýzou s celulóзовými membránami nebo přípravky na bázi (1→3)-β-D-glukanu z hub, jako je lentinan nebo podobné látky, mohou poskytnout falešně pozitivní výsledky.
- Koncentrace (1→3)-β-D-glukanu může dočasně vzrůst po operaci.
- Vysoká hladina endotoxinu může způsobit pozitivní chyby.
- Výsledky je třeba použít ve spojení s lékařským hodnocením a symptomy pacientů.

<Opatření týkající se likvidace>

- Činidla musejí být likvidována podle místních nebo národních předpisů.
- Všechna zařízení, včetně činidel a lahví s činidly, která přicházejí do styku se vzorky, je třeba považovat za potenciálně infekční.

Kontrola kvality

Pro klinické laboratoře se doporučuje program kontroly kvality. Pro sledování účinnosti postupu je u každého testu doporučena analýza pomocí kontrolní sady FUJIFILM Wako LAL. Hodnoty získané pro kontrolu musí být v rozmezí ±20 % přiřazených hodnot.

Podmínky skladování

Produkt	Podmínky skladování
β-Glucan Test R1: Přípravný roztok	Skladujte v teplotním rozmezí 2–10 °C
β-Glucan Test R2: LAL Reagent	Skladujte v teplotním rozmezí 2–10 °C

Reference

- 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 Bacteriologies, 38, 781-803, (1983) (v japonštině).
- 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) (v japonštině).
- Harada, K., Tsuchiya, M., et al.: 40th Japanese Society for Symposium of Toxins Proceedings, 155-158 (1993) (v japonštině).
- Interní data
- 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., ciae295 (2020).

Informace pro objednání

Kód	Produkt	Balení
993-04201	β-Glucan Test R1: Pretreatment Solution	50 x 0,9 ml
997-04101	β-Glucan Test R2: LAL Reagent	50 x pro 0,2 ml
995-04401	LAL Control R1: LAL Control (lyofilizovaný) R2: Control Dissolution Buffer	10 x pro 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 jednotek
995-05001	BC Tip EXT	100 špiček
991-05101	BC Tip 1000-R	100 špiček
993-04701	Toxinometer MT-6500	1 jednotka
999-04801	MT-6500 Extension Module	1 jednotka
993-03601	Thermostation TS 70/16	1 jednotka
998-22211	Cooling Station	1 jednotka

Produkt	Balení
LIMUSAVE MT-7500*	1 jednotka
LIMUSAVE MT-7500 Extension Module*	1 jednotka
LIMUSAVE MT-7500 THERMOSTATION TS-70/20*	1 jednotka

*Výrobce: FUJIFILM Corporation

