

MycAssay™ Aspergillus

Cepheid SmartCycler®

Respiratory Samples

REF 080-045

Avsedd användning

MycAssay™ Aspergillus är avsett att användas av kvalificerad laboratoriepersonal till kvalitativ bestämning av genomiskt DNA från *Aspergillus* spp. efter extrahering från prover tagna från de nedre luftvägarna (t.ex. bronkialprover) som hjälp vid diagnostisering av vuxna patienter med misstänkt infektion eller allergi orsakad av *Aspergillus*.

MycAssay™ Aspergillus har utvärderats för användning tillsammans med Cepheid SmartCycler® (med programmet Dx, versionerna 1.7b och 3.0)

Sammanfattning och förklaring

Aspergillus spp. är ett överallt förekommande opportunistiskt mögel som orsakar både allergiska och invasiva syndrom. Släktet består av cirka 300 arter, av vilka 41 har förknippats med sjukdom hos människor. De flesta infektionerna orsakas av *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* och *A. niger*; de mindre vanliga *A. nidulans* och andra sällsynta arter som *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. lentulus* och *A. pseudofischeri* har också antytts¹. De flesta infektioner och allergier som orsakas av *Aspergillus* spp. påverkar luftvägarna. De allergiska syndromen omfattar allergisk bronkopulmonell aspergillos (ABPA) och allergisk *Aspergillus*-sinusit och orsakas oftast av *A. fumigatus*. Kronisk pulmonell aspergillos inkluderar aspergillom, kronisk kavitär pulmonell aspergillos samt kronisk fibrös aspergillos. Invasiv aspergillos (IA) inträffar hos riskpatientgrupper, bland annat personer som behandlas med kortikosteroider och personer med neutropeni eller fagocytdysfunktion (t.ex. kronisk granulomatös sjukdom och HIV-infektion). Cirka 80 % av alla fall av invasiv aspergillos inbegriper lungorna².

Rutindiagnos av invasiv pulmonell aspergillos kan omfatta datortomografiskanning (CT), bronkoskopi och bronkoalveolärt lavage (mikroskopi och odling), *Aspergillus*-antigentestning av blod eller histologisk undersökning av kirurgiska biopsiprover. I detta scenario är odlingarna ofta falskt negativa³. Bronkoalveolärt lavage är faktiskt positivt vid odling i ungefär 40 % av fallen, även när diagnosen bekräftas på andra sätt^{4 5 6 7}, vilket visar bristen på odlingens sensitivitet för upptäckt av invasiv aspergillos och kronisk pulmonell aspergillos. Men odlingar är viktiga om de är positiva, eftersom många diagnostiska tester antingen inte anger släkte eller art för den svamp som orsakar infektionen, eller inte anger känslighetsprofilen för det isolat som orsakar infektionen.

Allergisk bronkopulmonell aspergillos komplicerar astma och cystisk fibros⁸ och kan i sällsynta fall förekomma utan underliggande sjukdom. De flesta fallen är kopplade till *A. fumigatus*, ibland tillsammans med andra svampar. Episodiska luftvägshinder med tjocka sputumpluggar fulla av *Aspergillus*-hyfer, total-IgE i serum >1000 IU/mL och detekterbara *A. fumigatus*-specifika IgE- och IgG-antikroppar eller ett positivt *Aspergillus*-pricktest är karakteristiskt för sjukdomen. Sputumodlingar kan vara positiva för *A. fumigatus* och bronkiektasier kan synas på bröst-CT.

Aktuella metoder för diagnos av kronisk pulmonell aspergillos är en blandning av radiologi (som inte är specifik)⁹ och serologi (*Aspergillus*-IgG-antikroppar eller precipitiner) som är positiv vid de flesta former av aspergillos (och alltså inte specifik för någon viss aspergillos). Odlingar är positiva i bara 40–65 % av de fall som bekräftats av radiologi och serologi^{10 11}. Eftersom det finns många differentialdiagnoser, exempelvis tuberkulos, atypisk mykobakterios, sarkoidos,

¹ Species Database in www.aspergillus.org.uk

² Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Medical Mycology*: 43 (suppl. 1): S207-38.

³ Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infectious Diseases*: 9: 609-22.

⁴ Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respir Med*: 86: 243-8.

⁵ Greub G and Bille J. (1998) *Aspergillus* species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to determine significance. *Clin Microbiol Infect* 4: 710-716.

⁶ Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA, and the Mycoses Study Group. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*; 33:1824–33.

⁷ Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. (2002). Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients *The Journal of Infectious Diseases*. 186:1297–306.

⁸ Tillie-Leblond I, Tonnel AB. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*: 60: 1004-13.

⁹ Greene R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*: 43 (Suppl 1): S147-54

¹⁰ Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. (2003). Chronic cavitory and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. *Clin Infect Dis*: 37 (Suppl 3): S265-80.

histoplasmos, coccidioidomykos, pneumokonios, reumatoid lunga och ankyloserande spondylit, är det viktigt att dokumentera förekomst av *Aspergillus* spp. i prover från luftvägarna för att undvika fördröjning av upptäckt av pulmonell aspergillos och felbehandling.

MycAssay™ Aspergillus är ett molekylärt diagnos-kit för påvisande av genom-DNA från *Aspergillus* spp. med hjälp av Molecular Beacon¹² realtids-PCR. Hela testproceduren, inbegripet extrahering av DNA från det kliniska provet, kan genomföras inom 4 timmar, vilket kan jämföras med svampodling som kan ta flera dagar för att ge positivt resultat. Denna analys har fördelar över de för närvarande tillgängliga diagnosmetoderna för akut invasiv och kronisk pulmonell aspergillos. Sådana fördelar är snabbare detektering av *Aspergillus* spp. och potentialen för ökad sensitivitet för *Aspergillus* spp. hos patienter med mycket nedsatt immunförsvar som misstänks ha invasiv pulmonell aspergillos.

Procedurens principer

När reagensen i MycAssay™ Aspergillus-kitet blandats med ett prov som innehåller mål-DNA-sekvensen för *Aspergillus* (ett avsnitt av den ribosomala 18S-genen för *Aspergillus*), resulterar termocyklning i DNA-amplifiering. Analysen innehåller också en Internal Amplification Control (IAC), ett DNA-fragment som inte finns i Aspergillusarter, andra svamp- eller bakteriegenom eller humana genom, för att upptäcka PCR-hämmande ämnen och bekräfta att analysreagensen fungerar.

De amplifierade DNA-målen detekteras med Molecular Beacon-teknik. Molecular Beacons är ensträngiga oligonukleotidhybridiseringssonder som bildar en stem-loop-struktur. Loopen innehåller en sondsekvens som är komplementär till en målsekvens, och stammen formas genom annealing av komplementära armsekvenser som finns på vardera sidan av sondsekvensen. En fluorofor, som fluorescerar när den exciteras av ljus med rätt våglängd, är kovalent bunden till en arms ände, och en utsläckare (quencher) som undertrycker fluoroforens fluorescens när de är fysiskt nära varandra är kovalent bunden till den andra armens ände. Molecular Beacons fluorescerar inte när de är fria i lösning. När de däremot hybridiserar till en nukleinsyrasträng som innehåller en målsekvens, genomgår de en konformationsändring som fysiskt separerar fluoroforen och utsläckaren, så att de kan fluorescera vid excitering. Mängden fluorescens vid en given cykel, eller efter cyklning, beror av mängden specifika amplikoner vid det tillfället. Realtids-PCR-systemet mäter samtidigt den fluorescens som emitteras av varje beacon.

Försiktighetsmått

- Kitet är avsett att användas enbart av utbildad laboratoriepersonal. Procedurer behövs för att hantera prover utan aerosolbildning. Vid all provhantering ska normala försiktighetsmått och arbetsplatsens riktlinjer följas. Ett säkerhetsdatablad kan rekvireras från Myconostica Ltd.
- Testet är endast avsett för *in vitro*-diagnostik.
- Testet är endast avsett för systemet Cepheid SmartCycler® med det diagnostiska programmet Dx, versionerna 1.7b och 3.0.
- Använd inte reagens eller kontroller om skyddspåsen är öppnad eller skadad vid leveransen.
- Reagens och kontroller är inte utbytbara mellan kit med olika lotnummer.
- Slå aldrig samman reagens eller kontroller från olika rör även om de har samma lotnummer.
- Använd aldrig reagens eller kontroller efter deras utgångsdatum.
- Reagens och kontroller ska inte frysas om eller användas senare efter öppnandet.
- Använd skyddskläder och engångshandskar när kitreagens hanteras.
- Undvik att förorena reagens med mikrober eller deoxyribonukleas (DNAs) när rörrinnehållet delas upp.
- Vi rekommenderar användning av sterila, DNAs-fria filterspetsar med låg retention eller pipettspetsar med positiv undanträngning.
- Använd en ny spets till varje prov eller reagens.
- Kasta oanvänt reagens och avfall enligt gällande regler.
- För att undvika förorening med *Aspergillus* eller IAC-amplikoner ska reaktionsrören inte öppnas efter amplifiering.
- Ytterligare kontroller kan testas enligt aktuella riktlinjer och regler.
- Ät, drick och rök inte i lokaler där prover eller kitreagens hanteras.
- Lågkoncentrerat DNA kan vara instabilt om det inte förvaras rätt. DNA-extrakt från kliniska prover bör förvaras vid -80 °C för att inte förfaras. Undvik så långt möjligt att upprepat tina och frysa om.

¹¹ Camuset J, Lavolé A, Wislez M, Khalil A, Bellocq A, Bazelly B, Mayaud C, Cadranel J. (2007). Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. Rev Pneumol Clin. 63:155-166.

¹² Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

Kitinnehåll

Beskrivning

Kitet innehåller fem förseglade foliepåsar med vardera tre fack. Påsarna kan tas upp och användas separat. Varje påse innehåller tillräckligt med reagens för 8 reaktioner.

		<u>Volym</u>
Rör 1 (Orange propp)	dNTPs MgCl ₂ Buffrad lösning av DNA-polymeraskomplex	66 µL
Rör 2 (Grön propp)	<0,01 % primers <0,01 % Molecular Beacons <0,0001 % Internal Amplification Control (IAC) Internal Amplification Control är en rekombinant DNA-plasmid som innehåller en icke infektiös sekvens som inte är relaterad till målsekvensen (<i>Aspergillus</i>) Tris-HCl-buffert	66 µL
Rör 3 (Genomskinlig propp)	Negativ kontroll Vatten	25 µL
Rör 4 (Svart propp)	Positiv kontroll <0,0001 % positivt kontroll-DNA Den positiva kontrollmolekylen är en rekombinant plasmid som innehåller <i>Aspergillus</i> -målsekvensen Tris-HCl-buffert	25 µL

Kitet innehåller även följande:

- CD-ROM-skivan MycAssay™ Aspergillus Myconostica Protocol
- Bruksanvisning
- Analyscertifikat

Förvaring

Kitet ska förvaras nedfryst (-15 till -25 °C) fram till det utgångsdatum som anges på kitlådans etikett. Efter detta datum ska kitet kastas enligt gällande bestämmelser.

När en påse öppnats, måste innehållet användas omedelbart. Det får inte frysas om eller användas vid ett senare tillfälle.

Utrustning och material som behövs men inte ingår

A. Utrustning som behövs

- SmartCycler® realtids-PCR-system (inkl. användarhandbok, tillhörande dator och programmet SmartCycler® Dx, version 3.0 eller 1.7b)
- SmartCycler® reaktionsrör
- Minicentrifug anpassad för SmartCycler® reaktionsrör
- Plastställ för SmartCycler® reaktionsrör

B. Vanlig utrustning som behövs

- Mikrocentrifug
- Vortexblandare
- Mikropipetter (volym 7,5 µL – 20 µL)
- Sterila filterspetsar med låg retention
- Engångshandskar, puderfria
- Lösning för DNA-dekontaminering (handelsvara)
- Permanent märkpenna

- Kit för DNA-isolering (se nedan)

Provet

Provet för analysen MycAssay™ Aspergillus är totalt genomiskt DNA som extraherats från klinisk bronksköljvätska och andra prover från de nedre luftvägarna. Nedanstående kit för isolering samt utrustning rekommenderas till detta ändamål och användes under valideringen.

- MycXtra™ Fungal DNA Extraction kit (**best.nr: 080-005 från Myconostica**)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Vortex adapterplatta (best.nr: 080-015 available from Myconostica)

Anmärkningar till proceduren

- Läs hela protokollet innan du börjar.
- Hela MycAssay™ Aspergillus-processen (undantaget DNA-extrahering) tar ungefär 2 timmar, beroende på antalet prover som testas.
- Testet bör ställas upp på en PCR-arbetsstation eller i ett pre-PCR-laboratorium. Om det inte finns någon tillgänglig PCR-arbetsstation bör testet ställas upp i en speciell del av laboratoriet¹³, avskild från områden som används vid DNA-extraheringar, som regelbundet rengörs med DNA-dekontaminerande reagens.
- Undvik däremot att använda DNA-dekontaminerande reagens när Realtids-PCR sätts upp eftersom de kan störa analysen.
- Använd mikropipetter vid överföring av vätskor. Särskilda mikropipetter bör användas vid uppställningen, och dessa bör regelbundet dekontamineras.
- Vi rekommenderar filterspetsar med låg retention för att säkerställa att inget DNA förloras under uppställningen.
- **Var försiktig vid hantering av Rör 4. Det innehåller positivt DNA-kontrollmaterial och kontaminering kan leda till falskt positiva testresultat.**
- Använd alltid handskar.
- Alla reagensrör måste tillslutas efter användning och innan de kastas.
- Var noga med att märka reagensrören till SmartCycler® på lämpligt sätt om flera patientprover bearbetas.
- Var noga när du väljer protokollfil: Välj ENDAST **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3** eller **MycAssay Aspergillus v1_3**; välj INTE **SERUM MycAssay Asp v1**.

Procedur för användningen

1. Uppställning av Realtids-PCR

- 1.1 Börja med att starta Realtids-PCR-systemet (instrument och tillhörande dator) och det aktuella programmet. Ange användarnamn och lösenord, om det behövs.
- 1.2 Kontrollera att arbetsområdet har rengjorts med DNA-dekontamineringsmedel och fått torka fullständigt. Använd inte sådana medel under uppställning av analysen, eftersom överskott av rengöringslösning kan inhibera PCR-reaktionerna.
- 1.3 En påse innehåller ett vardera av Rören 1 till 4. Det finns tillräckligt med reagens i en påse för att köra 8 reaktioner. Minst en positiv och en negativ kontrollreaktion måste genomföras per körning med reagens från samma kitlot. Med en påse kan man alltså analysera 6 patientprover. Om fler än 6 prover ska testas, kan fler än en påse användas om påsarna är från samma kitlot. Högst 38 patientprover kan testas med de fem påsarna i ett kit.
- 1.4 Beräkna antalet reaktioner som behövs med hjälp av tabellen nedan.

Antal påsar	Högsta antal patientprover
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

¹³ Se till exempel T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA.

- 1.5 Ta ut rätt antal påsar från frysen. Använd inte någon påse som inte längre är förseglad. Om patientproverna frysts efter extraheringen, ska även de tas ut ur frysen.
- 1.6 Riv upp så många påsar som behövs och ta ut rören. Om fler än en påse används, men bara en uppsättning positiva och negativa kontroller ska köras, är det bara nödvändigt att ta ut Rör 3 och 4 från en av påsarna. **Var försiktig vid hantering av Rör 4. Det innehåller positivt DNA-kontrollmaterial och kontaminering kan leda till falskt positiva testresultat.**
- 1.7 Låt rören tina i 5–10 minuter på laboratoriebänken, så att innehållet i alla rör är helt tinat innan arbetet fortsätter. Vortexblanda rören och patientproverna, följt av en kort körning i mikrocentrifug så att allt innehåll samlas i rörens botten före användning.
- 1.8 Sätt de SmartCycler®-reaktionsrör som behövs i deras ställ. **Var noga med att endast beröra rörens halsar med händerna.**
- 1.9 Ställ alltid upp den negativa kontrollen först, och sedan patientproverna. Den positiva kontrollen ska alltid ställas upp sist.
- 1.10 Reagens- och DNA-volymer visas i tabellen nedan.

Reagens	Reaktion		
	Negativ kontroll	Patientprov	Positiv kontroll
Rör 1 (orange propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 2 (grön propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 3 (genomskinlig propp)	10 µL	-	-
Patientprov	-	10 µL	-
Rör 4 (svart propp)	-	-	10 µL
Totalvolym	25 µL	25 µL	25 µL

- 1.11 Tillsätt reagens i tabellens ordning: Rör 1, sedan Rör 2 och därefter mallen (negativ kontroll, patientprov eller positiv kontroll). Var försiktig vid uppdelning av Rör 1. Vätskan är klabbig och kan fastna på rörets innerkant. I så fall ska röret centrifugeras igen, så att allt innehåll samlas i rörets botten innan de sista portionerna tas.
- 1.12 Använd en ny pipett till varje överföring av vätska. Förslut varje reagensrör efter användningen, och kasta det omedelbart tillsammans med eventuellt återstående innehåll i en behållare för kliniskt avfall som kan förslutas. Oanvänt reagens kan inte sparas till senare användning.
- 1.13 Var extra noga vid pipettering från Rör 4 (positivt kontroll-DNA) så att det inte kontaminerar något annat rör. Stäng locken på övriga rör innan Rör 4 öppnas för att minska risken för överföring av material.
- 1.14 Kontrollera att alla reaktionsrörens lock är ordentligt stängda och märk sedan varje lock med en permanent märkpenna, t.ex. POS för positiva kontroller, NEG för negativa kontroller och patient-ID för prover. Kör rören i 10 sekunder i den speciellt anpassade minicentrifugen. Kontrollera visuellt att det inte finns några bubblor i reaktionsblandningarna.
- 1.15 Fortsätt omedelbart till Avsnitt 2. MycAssay™ Aspergillus-reaktioner är stabila på bänken i upp till 60 minuter.
- 1.16 Kontrollera efter uppställningen (PCR set-up) att arbetsområdet är noggrant rengjort med DNA-dekontaminerande reagens.

2. Utföra körningen

Kontrollera före nästa avsnitt vilken programvaruversion som är installerad. Starta programmet, välj **Help** från verktygslisten och klicka på **About**.

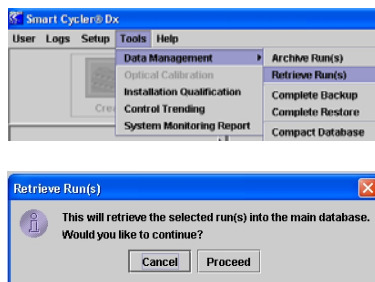
För version 1.7b följs anvisningarna i Avsnitt 2.1

För version 3,0 följs anvisningarna nedan i Avsnitt 2.2

Observera att särskild behörighet krävs i programmet för kommandona **Retrieve Run(s)** och **Import**. Behörigheter kan bara tilldelas av instruments **Administrator**.

2.1 SmartCycler® Dx programversion 1.7b

- 2.1.1 Starta programmet SmartCycler® Dx, version 1.7b, och ange användarnamn och lösenord.
- 2.1.2 Sätt in CD-ROM-skivan **MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol** och klicka på fliken **Define Assays**.
- 2.1.3 Gå till **Retrieve Run(s)** via **Tools** på menyraden och klicka på **Proceed**:



- 2.1.4 Välj filen **MycAssay Aspergillus Dx1_7bv1_3.DXA** från CD-ROM-skivan som på bilden nedan. Denna fil ska vara en av de två som känns igen av programmet.
- 2.1.5 På nästa skärm markerar du filnamnet **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3**, klickar på **OK**, och fortsätter med **Proceed** och **OK**.
- 2.1.6 Stäng programmet. När det startas igen, kan analysen **MycAssay Aspergillus Dx1.7b v1.3** användas till att skapa en ny körning.
- 2.1.7 Klicka på fliken **Create Run**. Skriv in ett namn på körningen (**Run Name**; det är lämpligt att åtminstone datum och operatörens namn ingår), eller låt fältet vara tomt om du vill att namnet ska skapas automatiskt av programmet.
- 2.1.8 Välj **MycAssay Aspergillus Dx1.7b v1.3** som analys.
- 2.1.9 Skriv in kitets **Lot Number** och **Expiration Date**. Lotnummer och utgångsdatum finns på kitlådan och på varje påse. Lotnumret har formatet M-XXXXXXXX.
- 2.1.10 Ange antalet prover i rutan **Number of specimens** och klicka på **Apply**. Prov-ID (**Sample ID**) för varje prov får automatiskt namnet **SPEC**. Ge därför varje plats ett identifierande namn. Dubbelklicka på **SPEC** och skriv in prov-ID.
Programmet tar automatiskt med en negativ och en positiv kontroll i realtids-PCR-körningen.
- 2.1.11 Placera försiktigt reaktionsrören i SmartCycler®-blocket och klicka på **Start Run**. OBS! Se till att rören placeras på rätt plats, eftersom det kanske inte är i samma ordning som uppsättningen. Notera körningens namn och klicka på **OK**. Körningen startar och röda indikatorer tänds över varje använd plats i blocket.
- 2.1.12 För att se hur lång tid körningen kommer att ta, klickar du på fliken **Check Status**. Körningens namn och följande körningstid visas.

2.2 Diagnosprogrammet SmartCycler® Dx, version 3.0

- 2.2.1 Starta programmet SmartCycler® Dx, version 3.0, och ange användarnamn och lösenord.
- 2.2.2 Sätt in CD-ROM-skivan **MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol** och klicka på fliken **Define Assays**.
Importera filen **MycAssay Aspergillus v1_3.sca** från skivan.
- 2.2.3 Klicka på fliken **Create Run**. Skriv in ett namn på körningen (**Run Name**; det är lämpligt att åtminstone datum och operatörens namn ingår), eller låt fältet vara tomt om du vill att namnet ska skapas automatiskt av programmet.
- 2.2.4 Välj **MycAssay Aspergillus v1.3** som analys.
- 2.2.5 Skriv in kitets **Lot Number** och **Expiration Date**. Lotnummer och utgångsdatum finns på kitlådan och på varje påse. Lotnumret har formatet M-XXXXXXXX.

- 2.2.6 Skriv in **Patient (Sample) ID** och **Number of specimens** (replikat) i respektive rutor och klicka på **Apply**. Gör det för alla patientprover som testas. Programmet tar automatiskt med en negativ och en positiv kontroll i realtids-PCR-körningen.
- 2.2.7 Placera försiktigt reaktionsrören i SmartCycler®-blocket och klicka på **Start Run**. OBS! Se till att rören placeras på rätt plats, eftersom det kanske inte är i samma ordning som uppsättningen. Notera körningens namn och klicka på **OK**. Körningen startar och röda indikatorer tänds över varje använd plats i blocket.
- 2.2.8 För att se hur lång tid körningen kommer att ta, klickar du på fliken **Check Status**. Körningens namn och följande körningstid visas.

3. Dataanalys och tolkning

- 3.1 Resultaten visas i programmet Dx från fliken **View Results**.
- 3.2 Klicka på knappen **View Another Run** längst ned på sidan, välj körning och klicka på **OK**.
- 3.3 **Patient Results** bör redan vara valt på listan **Views**. Patient-ID (prov-ID) och analysresultatet listas. Tolka resultaten med hjälp av tabellen nedan.

Resultat	Patient-resultat	Färg	Tolkning	Åtgärd
1	Negative	Grön	Negativt för <i>Aspergillus</i>	Rapportera resultat
2	Positive	Röd	Positivt för <i>Aspergillus</i>	Rapportera resultat
3	Invalid	Ljusgrå*	IAC-fel i provet	Upprepa provet
4	Invalid	Ljusgrå*	Fel i positiv eller negativ kontroll	Upprepa hela körningen

*Om resultatet rapporteras som ND, i ljusgrått, svarar det mot felkod 3079, resultatet av hög fluorescens i en eller flera kanaler. Om ett Ct-värde $\leq 36,0$ visas i Aspergillus-kanalen rapporteras det som positivt.

- 3.4 För att visa individuella provresultat separat för antingen *Aspergillus* eller IAC väljer du **Sample Results** från listan **Views** och klicka på varje måls flik. Resultaten visas i samma format som **Patient Results** men för varje individuellt mål.
- 3.5 Om ett patientprov rapporteras som Invalid, beror det på ett misslyckat IAC-resultat (anges som Unresolved på fliken **Sample Results**). Upprepa då reaktionen (plus positiva och negativa kontroller). Om reaktionen fortsätter att misslyckas, kan det finnas ett inhiberande ämne i mallen, och man kan inte lita på ett negativt resultat.
- 3.6 Du exporterar körningsdata till en annan dator genom att gå till **Tools** överst på skärmen, välja **Data Management** och sedan **Archive Run(s)** från rullgardinsmenyn. En meddelanderuta öppnas. Klicka på **Proceed**. Välj körning som ska arkiveras genom att markera kryssrutan till vänster och klicka på **OK**. En varning visas som anger hur många körningar som kommer att arkiveras. Om antalet stämmer, klickar du på **Proceed**. Välj var filen ska sparas, till exempel på ett USB-minne. Klicka på **Save** och notera filnamnet. Ett meddelande visas som anger hur många körningar som kommer att arkiveras. Om antalet stämmer, klickar du på **Proceed**.
- 3.7 För att importera körningsdata går du till **Tools** överst på skärmen, väljer **Data Management** och därefter **Retrieve Run(s)** från rullgardinsmenyn. En meddelanderuta öppnas. Klicka på **Proceed**. Gå till **Look In:** och välj lagringsenhet för körningsdata (se Avsnitt 3.4 ovan). Välj den fil som ska hämtas och klicka på **Open**. Ett fönster öppnas där du väljer den kärning som ska hämtas. Välj körning och klicka på **OK**. Ett meddelande visas som anger hur många körningar som kommer att arkiveras. Om antalet stämmer, klickar du på **Proceed**.
- 3.8 Om du dessutom behöver en papperskopia, klickar du på **Report** och **Print**.

4. Felsökning

4.1 Den negativa kontrollen har givit en positiv signal i FAM-kanalen:

- Kontaminering under uppställningen (set up). Inget resultat från körningen är tillförlitligt.
- Gör om hela körningen och var extra noggrann vid tillsättning av mallarna, och speciellt för den positiva kontrollen (Rör 4), så att oönskad överföring av material undviks.
- Se noga till att arbetsområdet och instrumenten är ordentligt dekontaminerade före och efter användning.
- Den negativa kontrollen var felplacerad i instrumentet.
- Kontrollera att reaktionsrören sitter på rätt plats.

4.2 Ct-värdet för den negativa IAC-kontrollen ligger inte inom tillåtet område:

- PCR har inhiberats

- Kontrollera noga att arbetsområdet och instrumenten är helt torra efter dekontamineringen före PCR-uppställningen.
- Kitet har inte förvarats som angivet i avsnittet Förvaring, eller utgångsdatum har passerats.
- Kontrollera att kitet förvarats på rätt sätt. Kontrollera utgångsdatum för reagensen (anges på lådan och påsens etikett) och upprepa med icke utgånget kit om det behövs.
- Reagens från Rör 1 eller Rör 2 hade inte tillsats till PCR-reaktionen, eller dubbla mängden från Rör 2 tillsattes.
- Gör om körningen och var noga med uppställningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser för höga eller för låga nivåer i ett reaktionsrör jämfört med andra.

4.3 Den positiva kontrollen är negativ:

- Kitet har inte förvarats som angivet i avsnittet Förvaring, eller utgångsdatum har passerats.
- Kontrollera att kitet förvarats på rätt sätt. Kontrollera utgångsdatum för reagensen (finns på lådan och påsens etikett) och upprepa med icke utgånget kit om det behövs.
- Ett fel inträffade under steg 1.12 och den positiva kontrollens mall (Rör 4) placerades i fel reaktionsrör.
- Upprepa körningen och var mycket noggrann under uppställningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser en högre vätskenivå i en reaktion och lägre i en annan, jämfört med normalt.
- Reagens från Rör 1 eller 2 tillsattes inte till reaktionen.
- Gör om körningen och var noga med uppställningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser lägre vätskenivåer i den reaktionen jämfört med normalt
- Den positiva kontrollen var felplacerad i instrumentet.
- Kontrollera att reaktionsrören sitter på rätt plats.

4.4 Patientprov(er) ger resultatet Outcome 3 – ”Invalid”:

- Det är troligt att ett eller flera extraherade patientprover innehåller PCR-inhibitorer.
- Vi rekommenderar att DNA från kliniska prover extraheras med MycXtra™ Fungal DNA Extraction kit.

4.5 Det finns inga resultat för någon kanal med prover eller kontroller:

- Kitet har inte förvarats som angivet i avsnittet Förvaring, eller utgångsdatum har passerats.
- Kontrollera att kitet förvarats på rätt sätt. Kontrollera utgångsdatum för reagensen (finns på lådan och påsens etikett) och upprepa med icke utgånget kit om det behövs.
- Utrustningen fungerar inte optimalt.
- Kontrollera att realtids-PCR-instrumentets servicehistorik är uppdaterad och att det kalibrerats fullständigt enligt installations- och underhållshandböckerna.
- Ett felaktigt protokoll användes under programmets set-up.
- Se Avsnitt 2 och välj rätt protokollfil för programmets typ och version från CD-ROM-skivan Myconostica Protocol. Endast rätt fil för programmet kan läsas in. Upprepa körningen med rätt protokollfil.

Kontakta Technical Support (mycotech@myconostica.co.uk) om du har fler frågor eller om du får problem.

Egenskaper och begränsningar

Analytisk sensitivitet

Med det ovan beskrivna protokollet och PCR-mallar skapade av Myconostica, bestämdes blankgränsen (Limit of Blank, LoB) för MycAssay™ Aspergillus till Ct=38,0, medan detekteringsgränsen (Limit of Detection, LoD) var <50 kopior av mål-DNA. Detta bestämdes med AF293-stammen av *Aspergillus fumigatus*, som har fullständigt sekvenserat genom. Man vet att det finns 37 kopior av målet i genomet, bestämt genom optisk mappning¹⁴ och 50 målkopior representerar alltså ungefär 1,3 genom.

Analytisk specificitet och selektivitet

Analytisk specificitet testades med DNA som extraherats från 15 olika Aspergillus spp., däribland flera stammar vardera *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* och *A. nidulans*. Signaler som detekterats över LoB noterades som positiva resultat.

Samtliga 15 *Aspergillus* spp. som testades var positiva i analysen. Förutom de tidigare nämnda omfattas *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, *A. sclerotiorum*, *A. niveus*, *A. lentulus*, *A. unguis*, *A. candidus*, *A. wentii*, *A. tubingensis* och *A. foetidus*.

Genomiskt DNA extraherat från *Penicillium* spp. gav också positiva resultat. Detta beror på att sekvenser av de molekylära målen är kraftigt bevarade mellan *Aspergillus* och *Penicillium*. Därför måste beaktas att positiva resultat från analysen kan bero på infektion med *Penicillium*, snarare än *Aspergillus*.

Analytisk selektivitet testades med DNA som extraherats från olika svamparter och andra arter. Följande arter gav inte positiva resultat:

Alternaria alternata, *Blastomyces capitatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cladosporium* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Doratomyces microsporus*, *Fusarium solani*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhodotonia rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon capitatum*. Följande bakteriearter gav inte positivt resultat: *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*.

Humant genomiskt DNA ger inte positivt resultat i denna analys.

Reproducerbarhet och repeterbarhet

Reproducerbarhet och repeterbarhet bestämdes av 5 olika operatörer som i triplikat testade en blindpanel med 7 olika mallar. Experimenten utfördes med 3 olika tillverkningssatser av MycAssay™ Aspergillus kit, på 3 olika instrument på 2 olika platser i Storbritannien.

Resultaten analyserades med avseende på blankgräns (LoB) och klinisk tröskel (CCO). Vid koncentrationen 3 gånger detekteringsgränsen (LoD), överensstämde resultaten från 100 % av alla prover (positivt) avseende blankgränsen (LoB), och 91% av proverna överensstämde avseende CCO. Vid koncentrationer högre än 3 x LoD överensstämde resultaten från 100 % av alla prover för såväl CCO som LoB. För negativa mallar var alla testade prover negativa vid CCO.

Störande ämnen (kontraindikationer mot användning)

Följande substanser testades vid kliniskt relevanta koncentrationer och befanns inte inhibera analysen: acetylcystein, amfotericin, beclometasondipropionat, budesonid, colistimetatnatrium, flutikasonpropionat, formoterolfumaratdehydrat, ipratropiumbromid, lidokain, mannitol, salbutamolsulfat, salmerterol, natriumklorid, natriumkromoglikat, terbutalin, tobramycin.

¹⁴ Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature: 438: 1151-6.

Prestandautvärdering

Prover från luftvägar (BAL) som insamlats från 2 sjukhus, extraherats med kitet MycXtra™ och förvarats, användes för att utvärdera MycAssay™ Aspergillus kit med kliniska prover. Jämförelser gjordes med såväl klinisk diagnos som odling.

Tröskeln Ct=36,0 fastställdes efter genomgång av en uppsättning prover från platser och olika patientpopulationer. Olika trösklar utvärderades avseende sannolikheten för differentiering mellan sjukdom och icke sjukdom.

PCR jämfört med klinisk diagnos

	Kliniskt positiv	Kliniskt negativ		
PCR positivt	31	1	0,97	PPV
PCR negativt	2	10	0,83	NPV
	0,94	0,91		
	Sensitivitet	Specificitet		

PCR jämfört med *Aspergillus*-odling

	Odling positiv	Odling negativ		
PCR positivt	29	3	0,91	PPV
PCR negativt	2	10	0,83	NPV
	0,94	0,77		
	Sensitivitet	Specificitet		

Av de testade proverna innehöll 0,8 % PCR-inhibitorer enligt IAC efter extrahering med kitet MycXtra™.

Klinisk rapportering

Anm: När du granskar resultatrapporten ska du kontrollera att rätt protokoll har använts. För prover från luftvägarna måste MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3 eller MycAssay Aspergillus v1_3 användas. Protokollet SERUM MycAssay Asp v1 får endast användas tillsammans med MycAssay Aspergillus SmartCycler Serum IFU (artikelnummer. 030-169). Om fel protokoll används blir resultaten "Invalid".

Kitet MycAssay™ Aspergillus är avsett som en hjälp vid diagnosticering. Resultaten måste bedömas tillsammans med patientens kliniska tillstånd och andra diagnostiska testresultat.

Följande rapportering rekommenderas, beroende av tolkningen av resultaten:

Resultat 1

"*Aspergillus* spp. detekterades inte."

Resultat 2

"*Aspergillus* spp. detekterades; positivt resultat. Denna analys detekterar även *Penicillium* spp.."

Resultat 3

"Testet misslyckades. Inhibitorer eller andra okända ämnen närvarande."

Procedures begränsningar

- Procedures principiella begränsningar är kopplade till primärprovets kvalitet.
 - Om provet är mycket litet eller inte tagits från den påverkade delen av lungan, kommer testet att vara mindre känsligt och kan bli falskt negativt.
 - BAL-prover bör centrifugeras innan DNA extraheras.
 - Data visade även att en minskning av den supernatantvolym som erhållits vid centrifugeringen och används vid extraheringen minskar andelen inhibitorer som införs i systemet.
- Falskt positiva resultat kan bli följden om infektionen orsakats av *Penicillium* spp., som inte kan skiljas från *Aspergillus* spp. med detta kit.

- Trots att extraheringsproceduren MycXtra™ Fungal DNA är konstruerad för att avlägsna PCR-inhibitorer har inte alla läkemedel eller patientpopulationer utvärderats.
- Proceduren har inte utvärderats fullt med sputum, och har inte utvärderats med saltsköljningar eller prover från barn.
- Falskt positiva resultat kan uppkomma genom extern kontaminering av primärprovet eller testet. Sådan kontaminering kan härröra från *Aspergillus*-kontaminerad luft, dåligt utförande beträffande den positiva kontrollen eller extern kontaminering (särskilt vid pipettering) med *Aspergillus*-DNA.
- Ett sant positivt resultat kan erhållas från patienter som är övergående eller permanent koloniserade med *Aspergillus*-spp.. Kliniskt omdöme krävs vid tolkning av testresultaten.

LICENSER

TopTaq™ Hot Start tillhandahålls av QIAGEN. QIAGEN® är ett registrerat varumärke som tillhör Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland.

Den här produkten säljs under licens från Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, USA och får användas under PHRI-patenträttigheter endast för human in vitro-diagnostik.

SmartCycler® är ett registrerat varumärke som tillhör Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, USA.

En del av denna produkt omfattas av en exklusiv licens för en patentansökan från Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, USA.

IVD



Myconostica Limited, South Court, Sharston Road, Sharston, Manchester, M22 4SN, Storbritannien.
Telefon: +44 (0) 161 998 7239 Fax: +44 (0) 161 902 2496
e-post: mycotech@myconostica.co.uk

