

MycAssay™ Aspergillus

Applied Biosystems 7500

Respiratoriska Prover

REF 080-045

Avsedd användning

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

MycAssay™ Aspergillus har utvärderats för användning med Applied Biosystems 7500 (med SDS-program version 1.4).

Sammanfattning och förklaring

Aspergillus-arter är vanligt förekommande opportunistiska svampar som kan orsaka såväl allergiska som invasiva syndrom. Släktet har ungefär 300 arter, av vilka 41 har kopplats till sjukdomar hos människan. Majoriteten av infektionerna orsakas av *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* och *A. niger*; mindre ofta av *A. nidulans*. Andra, sällsyntare, arter som *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. lentulus* och *A. pseudofischeri* har varit delaktiga¹. De flesta infektioner och allergier som orsakas av *Aspergillus*-arter påverkar luftvägarna. Allergiska syndrom är till exempel allergisk bronkopulmonell aspergillos (ABPA) och allergisk *Aspergillus*-sinuit, och är vanligen orsakade av *A. fumigatus*. Kronisk pulmonell aspergillos omfattar aspergillom, kronisk kavitär pulmonell aspergillos och kronisk fibrotiserande aspergillos. Invasiv aspergillos (IA) förekommer i riskpatientgrupper, inbegripet patienter behandlade med kortikosteroider eller patienter med neutropeni eller fagocytdysfunktion (t.ex. kronisk granulomatös sjukdom och HIV-infektion). Ungefär 80 % av fallen av invasiv aspergillos involverar 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 biopsprover. 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 diagnosiska 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 >1 000 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)¹. 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, histoplasmos, coccidioidomykos, pneumokonios, reumatoid lunga och ankyloserade spondylit, är det viktigt att

¹ Artdatabas på 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 cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. *Clin Infect Dis*: 37 (Suppl 3): S265-80.

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

dokumentera förekomst av *Aspergillus*-arter i prover från luftvägarna för att undvika fördröjning av upptäckt av lungaspergillos och felbehandling.

MycAssay™ Aspergillus är ett molekylärt diagnos-kit för påvisande av genom-DNA från *Aspergillus*-arter 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*-arter och potentialen för ökad sensitivitet för *Aspergillus*-arter 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 Aspergilli, andra svamp-, bakterie- 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. Slingan innehåller en sondsekvens som är komplementär till en målsekvens, och stammen formas genom annealing av komplementära armsekvenser som finns på vardera sidan av sondesekvensen. 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. Mänden 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 rekvideras från Myconostica Ltd.
- Testet är endast avsett för in vitro-diagnostik.
- Testet ska enbart användas med Applied Biosystems 7500 med SDS-programversion 1.4.
- 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 rörinnehållet 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 ampliiering.
- 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.
- Kitet validerades med PCR-plattor med 96 0,2 mL kantade/upphöjda brunnar och förslutningsfilm av optisk kvalitet (Star Lab kat.nr. E1403-8200 och Applied Biosystems kat.nr. 4311971). Användning av andra källor/typer av plast kan göra trösklarna och därmed uppgifterna i bruksanvisningen ogiltiga. Om en annan källa används, rekommenderas att en lokal validering utförs med de positiva och negativ kontrollreaktionerna.

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 (Klar propp)	Negativ kontroll Vatten	25 µL
Rör 4 (Svart propp)	Positiv kontroll <0,0001 % positiv kontroll-DNA Den positiva kontrollmolekylen är en rekombinant plasmid som innehåller <i>Aspergillus</i> -målsekvensen Tris-HCl-buffert	25 µL

Kitet innehåller även följande:

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

Förvaring

Kitet ska förvaras nedfryst (–15 till –25 °C) fram till dt 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

- Applied Biosystems Realtids-PCR-system (inkl. användarhandbok, tillhörande dator och programmet SDS, version 1.4)
- Provpplattor med 96 kantade/upphöjda brunnar och förslutningsfilm av optisk kvalitet (Star Lab kat.nr. E1403-8200 och Applied Biosystems kat.nr. 4311971)
- Ställ för 96-brunnarsplatta
- Centrifug med hållare för 96-brunnarsplatta

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 märkpena
- 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 från 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.
- Notera noggrant provernas platser på 96-brunnarsplattan på en plattkarta.

¹³ For example see Mifflin, 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.

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

- 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 rören 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 Placera 96-brunnsplattan i ett ställ. Var noga med att endast beröra plattans kant med händerna.
- 1.9 Sätt alltid upp den negativa kontrollen först, och sedan patientproverna. Den positiva kontrollen ska alltid sättas 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 (klar propp)	10 µL	-	-
Patientprov	-	10 µL	-
För 4 (svart propp)	-	-	10 µL
Total volym	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 offentlig 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. Onvänt 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 Anteckna platsen på plattan för varje prov på en plattkarta. Försegla plattan omsorgsfullt och fullständigt med fil av optisk kvalitet. Se till att kanterna sitter fast ordentligt. Centrifugera plattan vid 900 g i 1 minut. Kontrollera att det inte finns några bubblor i brunnarnas botten. Centrifugera på nytt om bubblor syns.
- 1.15 Fortsätt omedelbart till avsnitt 2. MycAssay™ Aspergillus-reaktioner är stabila på bänken i upp till 60 minuter.
- 1.16 Kontrollera efter uppställningen att arbetsområdet är noggrant rengjort med DNA-dekontaminerande reagens.

2. Utföra körningen

- 2.1 Starta programmet AB 7500 SDS version 1.4 och ange användarnamn och lösenord.
- 2.2 Sätt in CD-ROM-skivan **MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol**.
- 2.3 Från menyn **Quick Startup** väljer du det första alternativet, **Create New Document...**
- 2.4 Välj inställningar som visat nedan. Välj mallen **MycAssay Aspergillus v1_2.sdt** från CD-ROM-skivan via **Browse...**
- 2.5 Ge körningen ett namn som svarar mot plattan. Exempel:

New Document Wizard

Define Document
Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.

Assay: Standard Curve (Absolute Quantitation)

Container: 96-Well Clear

Template: MycAssay Aspergillus v1_2.sdt

Run Mode: Standard 7500

Operator: your.name

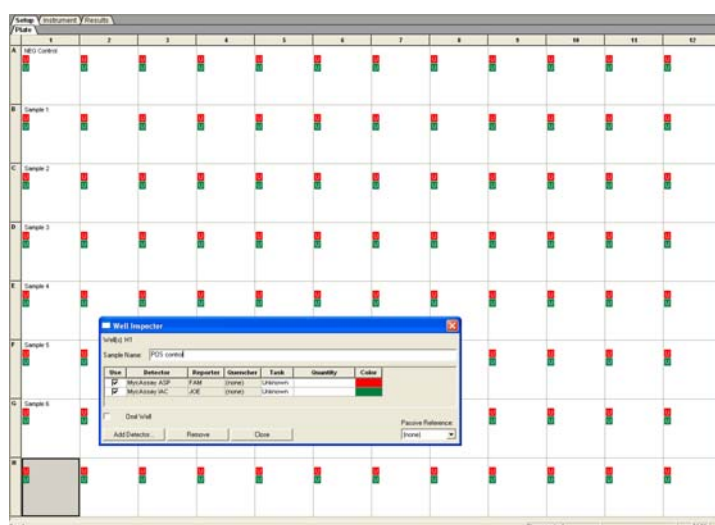
Comments:

Plate Name: Aspergillus_04JAN10_name

< Back Next > Finish Cancel

- 2.6 Klicka på **Finish**. Ett nytt dokument öppnas med PCR-parametrar och detektorer automatiskt valda för analysen. I vyn **Plate** på fliken **Setup** använder du **Well Inspector** (välj en brunn och klicka på Ctrl+1 eller högerklicka med musen) för att ge brunnarna namn som svarar mot provernas platser i 1.12.

Exempel:



- 2.7 När alla brunnar fått namn, sparar du körningen och behåller **Plate Name** som filnamn.
- 2.8 Starta körningen från fliken **Instrument** genom att klicka på knappen **Start**.
- 2.9 En nedräkning bredvid **Start**-knappen visar hur lång tid körningen tar.

3. Dataanalys och tolkning

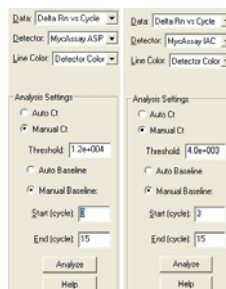
- 3.1 När körningen är klar, uppdaterar du genom att klicka på den gröna pilen på den översta menyraden.
3.2 Öppna vyn **Amplification Plot** på fliken **Result**. På den högra sidan anger du trösklar för varje kanal:

Asp MycAssay = 12000

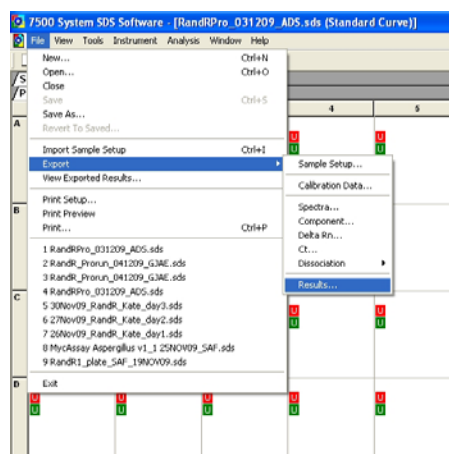
IAC MycAssay = 4000

Manual Baseline bör hållas oförändrad vid 3–15 för båda detektorerna.

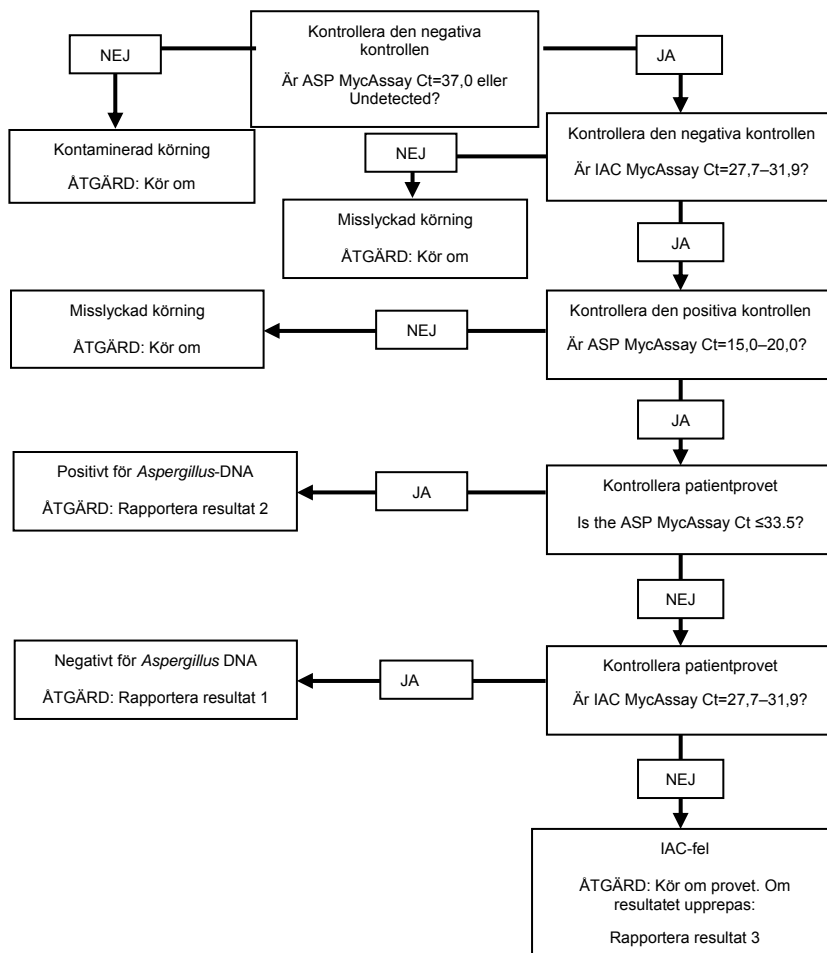
- 3.3 Klicka på knappen **Analyze** för att aktivera ändringarna. Exempel:



- 3.4 Spara ändringarna.
3.5 Välj de brunnar som innehåller prov och exportera rapportfilen **File>Export>Results...** som visat nedan:



- 3.6 För att inte blanda samman data sparar du filen med samma namn som körningen. Kom ihåg att spara filen till en lämplig plats.
3.7 Vid uppmaningen aktiverar du **Export only selected wells**, och klickar på **OK**.
3.8 Du kan öppna den sparade -csv-filen med Excel eller liknande kalkylarksprogram.
3.9 Analysera varje prov. Börja med kontrollerna enligt flödesschemat nedan (mer information finns även i tabellen under schemat).



Prov	ASP MycAssay Ct	IAC MycAssay Ct	Tolkning	Åtgärd
Negativ kontroll	37,0 eller Undetected	Inom 27,7-31,9	Acceptabel negativ kontroll	Patientresultat tillförlitliga
Negativ kontroll	37,0 eller Undetected	<27,7 eller >31,9	Fel för negativ kontroll	Upprepa hela körningen
Negativ kontroll	<37,0	Inom 27,7-31,9	Förorening	Upprepa hela körningen
Positiv kontroll	Inom 15,0-20,0	Ej tillämpligt	Acceptabel positiv kontroll	Patientresultat tillförlitliga
Positiv kontroll	<15,0 eller >20,0	Ej tillämpligt	Fel för positiv kontroll	Upprepa hela körningen
Patient	>33,5	Inom 27,7-31,9	Negativ för <i>Aspergillus</i> vid CCO*	Rapportera resultat: Resultat 1
Patient	≤33,5	Ej tillämpligt	Positiv för <i>Aspergillus</i> vid CCO*	Rapportera resultat: Resultat 2
Patient	37,0 eller Undetected	<27,7 eller >31,9	IAC-fel i provet	Upprepa provet: Resultat 3

*CCO = klinisk tröskel (clinical cut-off). Alla resultat vid eller under denna nivå anses vara klinisk positiva. Andra prover kan ge Ct-värden >33,5, men de avspeglar normala nivåer eller bakgrundsnivåer för *Aspergillus*-belastning i luftvägsprovet.

Se Klinisk rapportering (Resultat 1, 2 eller 3)

4. Felsökning

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

- Kontaminering under uppsättningen. 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.
- Var noga med att brunnarna är rätt markerade i programmet.
- Andra plattor än de rekommenderade har använts.
- Trösklarna gäller endast vid användning av de rekommenderade PCR-plattorna med 96 0,2 mL kantade/upphöjda brunnar och förslutningsfilm av optisk kvalitet (Star Lab kat.nr. E1403-8200 och Applied Biosystems kat.nr. 4311971).

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

- **PCR har inhiberats**
- Kontrollera noga att arbetsområdet och instrumenten är helt torra efter dekontamineringen före PCR-uppsättningen.
- 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 utgången kit om det behövs.
- Reagens från rör 1 eller rör 2 hade inte tillsatts till PCR-reaktionen, eller dubbla mängden från rör 2 tillsattes.
- Gör om körningen och var noga med uppsättningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser för höga eller för låga vätskenivåer i en brunn jämfört med andra.
- Andra plattor än de rekommenderade har använts.
- Trösklarna gäller endast vid användning av de rekommenderade PCR-plattorna med 96 0,2 mL kantade/upphöjda brunnar och förslutningsfilm av optisk kvalitet (Star Lab kat.nr. E1403-8200 och Applied Biosystems kat.nr. 4311971).

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 utgången 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 uppsättningen. 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 uppsättningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser lägre vätskenivåer i den reaktionen jämfört med normalt
- Den positiva kontrollen var felplacerad i instrumentet.
- Var noga med att sätta reaktionsrören på rätt platser respektive att brunnarna är rätt markerade i programmet.
- Andra plattor än de rekommenderade har använts.
- Trösklarna gäller endast vid användning av de rekommenderade PCR-plattorna med 96 0,2 mL kantade/upphöjda brunnar och förslutningsfilm av optisk kvalitet (Star Lab kat.nr. E1403-8200 och Applied Biosystems kat.nr. 4311971).

4.4 Patientprov ger resultatet Outcome 3 – "Invalid":

- Ett eller flera extraherade patientprover innehåller PCR-inhibitorer.
- Vi rekommenderar att DNA från kliniska prover extraheras med kitet 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.
- An incorrect protocol file was used during the software 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

Analytiska prestandadata för AB7500

Kitet validerades först med Cepheid SmartCycler®. Vissa anspråk beträffande analysens prestanda omvaliderades på plattformen AB7500, med användning av PCR-plattor med 96 0,2 mL kantade/upphöjda brunnar och förslutningsfilm av optisk kvalitet (Star Lab kat.nr. E1403-8200 och Applied Biosystems kat.nr. 4311971), och rapporteras nedan. Där skillnaderna mellan plattformarna inte förväntades påverka analysens prestanda eller anspråken, upprepades inte studien. Dessa resultat, erhållna med SmartCycler®, anses överförbara till plattformen AB7500.

Analytisk sensitivitet

Med det ovan beskrivna protokollet för AB7500 och PCR-mallar skapade av Myconostica, bestämdes blankgränsen (Limit of Blank, LoB) för MycAssay™ Aspergillus till Ct=37,0, medan detekteringsgränsen (Limit of Detection, LoD) bestämdes till <25 kopior av mål-DNA. Detta bestämdes med AF293-stammen av *Aspergillus fumigatus*.

Analytisk selektivitet

Genomiskt DNA extraherat från *Penicillium*-arter gav 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:

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

Humant genomiskt DNA ger inte positivt resultat i denna analys.

Följande 3 svamparter testades inte på AB7500-systemet, men hade testats på SmartCycler®: *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* och *Alternaria alternata*. Samtliga tre gav negativa resultat i analysen.

Reproducerbarhet och repeterbarhet

Reproducerbarhet och repeterbarhet testades av 4 olika operatörer med 7 olika mallar i triplikat, i totalt 168 analyser. Experimenten utfördes med 1 tillverkningssats av MycAssay™ Aspergillus kit, på 2 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 83% 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.

Överföring av den kliniska tröskeln (Clinical Cut-Off, CCO)

Den kliniska tröskeln 36,0 hade bestämts för SmartCycler®. Denna tröskel överfördes analytiskt till AB7500-plattformen med en mall med en *Aspergillus*-koncentration som visats ge ≥95 % positiva resultat vid CCO på SmartCycler®. Ct-värdet 33.5 bestämdes, vilket bekräftades med mallar med 3 olika koncentrationer.

Följande prestandaanspråk fsatställdes vid användning av Cepheid SmartCycler®

Störande ämnen (kontraindikationer mot användning)

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

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

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*-arter detekterades inte"

Resultat 2

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

Resultat 3

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

Procedurens begränsningar

- Procedurens 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*-arter, som inte kan skiljas från *Aspergillus*-arter 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 fult 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 premanent koloniserade med *Aspergillus*-arter. 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.

Applied BioSystems är ett registrerat varumärke som tillhör Applied Biosystems Corporation eller dess dotterbolag i USA och/eller vissa andra länder.



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

