

MycAssay™ Aspergillus

Stratagene Mx3000-serien

Respiratoriska Prover

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 validerats för användning med Stratagene-instrument i Mx3000-serien, antingen Mx3000P® eller Mx3005P®, (med användning av MxPro programversion 4.10).

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, vilket visar bristen på odlingens sensitivitet för upptäckt av invasiv aspergillos och kronisk pulmonell aspergillos.^{4 5 6 7} 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 *Aspergillus*-arter, 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 ampliconer 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.
- Detta test får endast användas med Stratagene-instrument i Mx3000-serien, antingen Mx3000P® eller Mx3005P®, (med användning av MxPro programversion 4.10).
- Vid valideringsstudier observerades följande, specifikt för detta instrument;
 - Om instrumentet har använts alldeles nyss ska du låta lampan svalna i minst en timme innan du förbereder en MycAssay™ Aspergillus-körning, annars kan sensitiviteten påverkas vilket leder till falskt negativa resultat.
 - Precisionen är lägre vid låga koncentrationer vid och kring den kliniska tröskeln jämfört med andra instrument som vi har testat.
- 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-ampliconer 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.

¹¹Camuset J, Lavalé 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.

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

- 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.
- Detta kit har validerats med användning av en remsa med 8 st. 0,2 ml PCR-rör med vidhängande proppar (Starlab art.nr. A1402-3700). Om andra källor/plasttyper används kan tröskelvärdena bli ogiltiga, och därmed de påståenden som görs i bruksanvisningen. Det rekommenderas att om en alternativ källa används, lokal validering genomförs med positiva och negativa kontrollreaktioner.

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

- Stratagene realtids-PCR-system, Mx3000-serien, (inkl. användarhandbok, tillhörande dator och programmet MxPro, version 4.10).
- Remsor med 8 st. 0,2 ml PCR-rör med vidhängande proppar (Starlab art.nr. A1402-3700)
- Ställ för 0,2 ml provrör (remсор med 8 st.)
- Minicentrifug anpassad för 0,2 ml provrör i remсор om 8 st
- 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.
- På Stratagene Mx3000-serien: numrera de plastremsor som fäster proppen i provröret (inte själva proppen) och gör en anteckning om vad varje nummer motsvarar.
- Låt lampan svalna i minst en timme efter en körning innan du förbereder en MycAssay™ Aspergillus-körning för att minimera antalet falskt negativa resultat. Efter denna avsvältningsperiod behöver lampan en uppvärmningsperiod på 20 minuter, se stycke 1.1 nedan

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. Lampan behöver en uppvärmningsperiod på 20 minuter. Starta inte körningen förrän lampan är klar.
- 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.

¹³ Se till exempel 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.

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

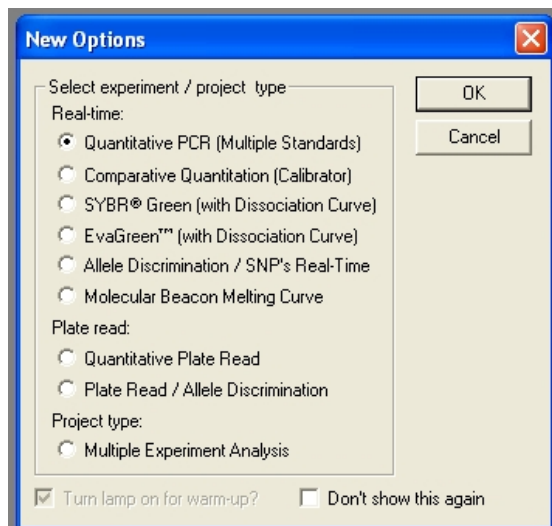
- 1.5 Ta ut rätt antal påsar från frysen. Använd inte någon påse som inte längre är förseglad. Om patientproverna frysts efter extraheringen, ska även de tas ut ur frysen.
- 1.6 Riv upp så många påsar som behövs och ta ut rören. Om fler än en påse används, men bara en uppsättning positiva och negativa 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 laboriebänken, 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. Sätt erforderligt antal 0,2 ml PCR-rör i ett ställ. Var noga med att inte lämna några märken på det optiska locket.
- 1.8 Ställ alltid upp den negativa kontrollen först, och sedan patientproverna. Den positiva kontrollen ska alltid ställas upp sist.
- 1.9 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
Totalvolymer	25 µL	25 µL	25 µL

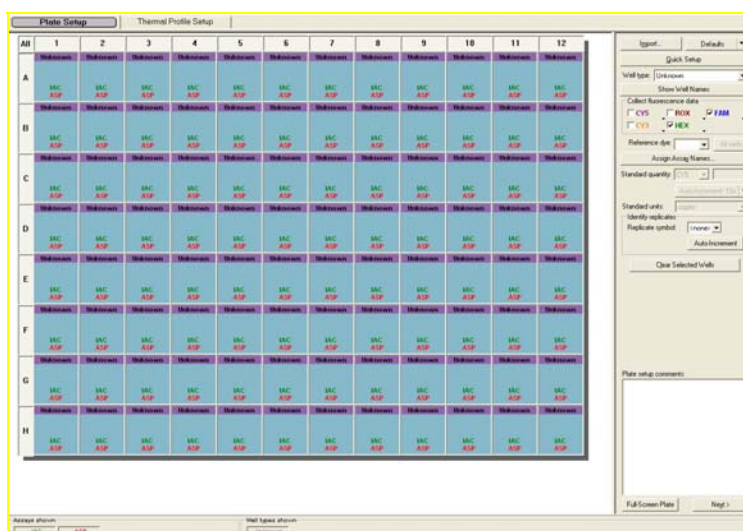
- 1.10 Tillsätt reagens i tabellens ordning: rör 1, sedan Rör 2 och därefter mallen (negativ kontroll, patientprov eller positiv kontroll). Var försiktig vid uppdelning av rör 1. Vätskan är klabbig och kan fastna på rörets innerkant. I så fall ska röret centrifugeras igen, så att allt innehåll samlas i rörets botten innan de sista portionerna tas.
- 1.11 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. Onvänt reagens kan inte sparas till senare användning.
- 1.12 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.
- 1.13 Kontrollera att locken på alla reaktionsrör är ordentligt stängda, men märk inte själva locken. Använd istället den plastremsa som fäster proppen i provröret. Centrifugera rören i 10 sekunder i den minicentrifug som är anpassad för 0,2 ml PCR-rör.
- 1.14 Fortsätt omedelbart till Avsnitt 2. MycAssay™ Aspergillus-reaktioner är stabila på bänken i upp till 60 minuter.
- 1.15 Kontrollera efter uppställningen (PCR set-up) att arbetsområdet är noggrant rengjort med DNA-dekontaminerande reagens.

2. Utföra körningen

- 2.1 Öppna MxPro-programmet, version 4.10.
- 2.2 Sätt in CD-ROM-skivan MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol.
- 2.3 I menyn New Options väljer du det första alternativet: Real Time: Quantitative PCR (Multiple Standards), och klickar på OK, så som visas:

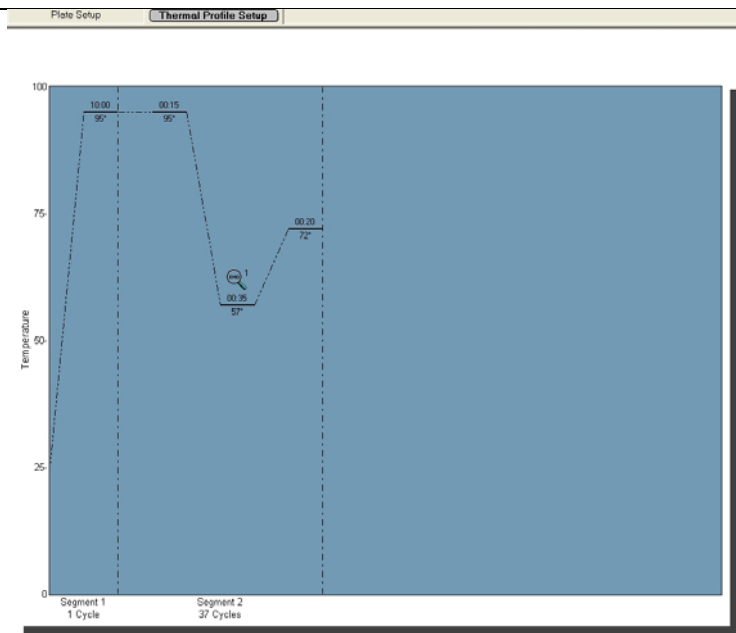


- 2.4 Klicka på knappen **Import** till höger på fliken **Plate Setup**. Välj **MycAssay Asp Myconostica Protocol CD-ROM** i rullgardinslistan vid **Look-In:** och importera sedan filen **MycAssay Aspergillus v2.mxp**. Klicka på **Finish**. När detta är gjort ska **Plate Setup** se ut som i detta exempel;



- 2.5 Vi rekommenderar att, för de brunnar som är tomma, ställa in **Well Type** på **<blank>** för att förhindra att ljusrefraktion från plasten interfererar med signalen från de brunnar som innehåller reaktioner.

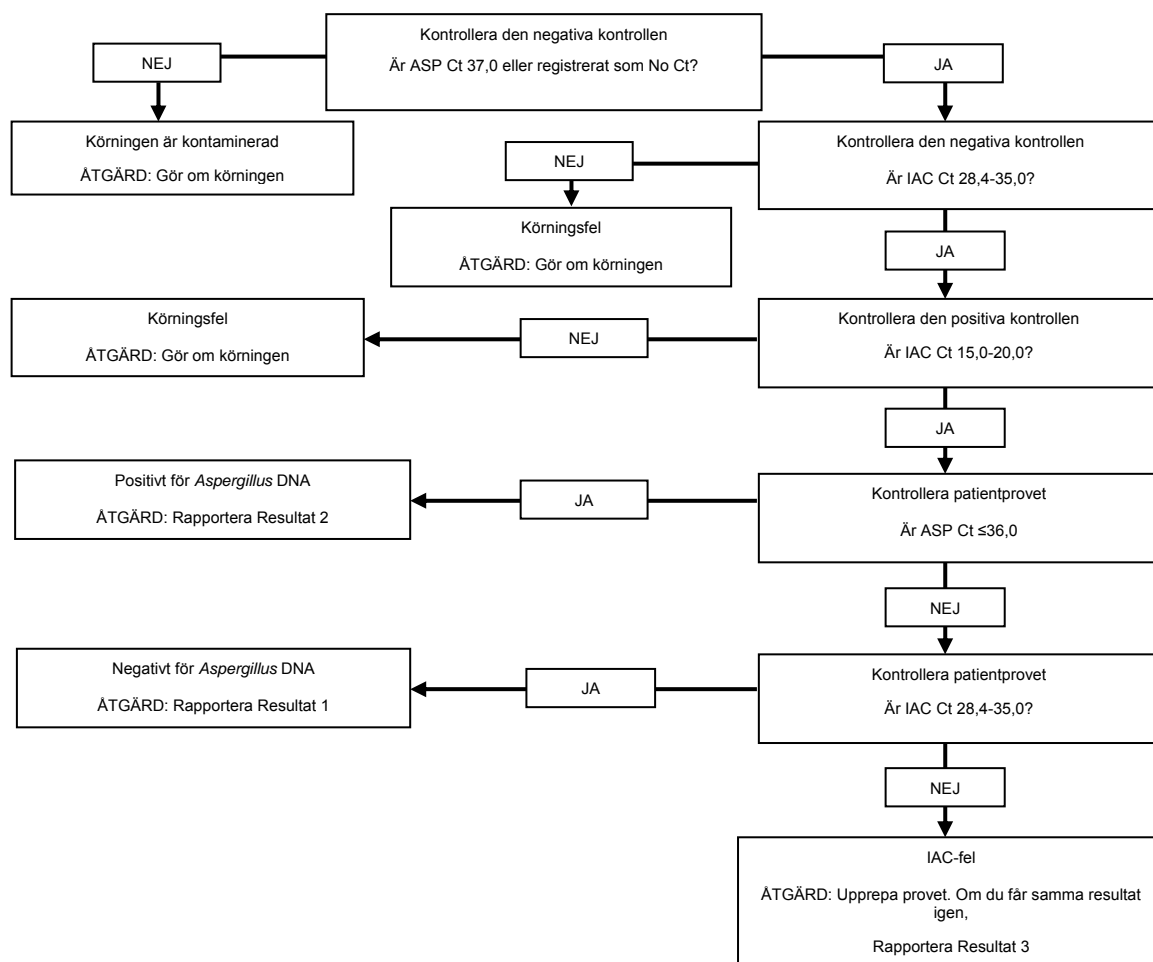
- 2.6 Upprepa importprocessen på fliken **Thermal Profile Setup** för att importera PCR-programmet för denna analys. Ställ in **Thermal Profile Design** på **Custom** och kör sedan **Import** av samma fil som i beskrivningen i 2.4. När detta är gjort ska **Thermal Profile Setup** se ut som i detta exempel:



- 2.7 Namnge brunnarna på lämpligt sätt på fliken **Plate Setup**. Högerklicka på en markerad brunn (eller grupp av brunnar vid replikat) och välj **Well Information** i listan med alternativ. Skriv in namnet på det prov som används i den brunnen i sektionen **Name**:
- 2.8 När alla brunnarna har fått lämpliga namn sparar du körningen, ger den ett passande filnamn som innehåller datum och operatörens initialer och startar sedan körningen genom att välja knappen **Run** högst upp till höger på skärmen under fliken **Instrument**. Kontrollera att kryssrutan är markerad så att lampan släcks när körningen är slutförd. Klicka därefter på knappen **Start** i det nedre högra hörnet.
- 2.9 Kom ihåg att låta instrumentet svalna i minst en timme innan du börjar från moment 1.1 igen.

3. Dataanalys och tolkning

- 3.1 Så snart körningen är klar kan du granska resultaten genom att välja knappen **Analysis** högst upp till höger på skärmen, följt av fliken **Results**.
- 3.2 Markera området **Amplification Plots analysis** och ställ in tröskelvärdena för varje kanal på följande sätt, och lås dem genom att klicka på hänglåsikonen:
ASP = 1000
IAC = 100
- 3.3 **Adaptive Baseline** ska också vara valt, detta är oftast standardinställningen i programmet.
- 3.4 Spara ändringarna. Varje kanal kan granskas för sig genom att klicka i och markera/avmarkera rutorna i sektionen Assays Shown till vänster nedtill på skärmen.
- 3.5 Data kan exporteras till Excel för fortsatt bearbetning med **File>Export Text Report>Export Text Report to Excel**. Endast brunnar/färgningar som har markerats blir exporterade, så se till att alla relevanta/erforderliga brunnar/färgningar är valda.
- 3.6 Du kan öppna den sparade .csv-filen med Excel eller liknande kalkylprogram.
- 3.7 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 28,4-35,0	Acceptabel negativ kontroll	Patientresultat tillförlitliga
Negativ kontroll	37,0 eller Undetected	<28,4 eller >35,0	Fel för negativ kontroll	Upprepa hela körningen
Negativ kontroll	<37,0	Inom 28,4-35,0	Kontamination	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	>36,0	Inom 28,4-35,0	Negativ för <i>Aspergillus</i> vid CCO*	Rapportera resultat: Resultat 1
Patient	≤36,0	Ej tillämpligt	Positiv för <i>Aspergillus</i> vid CCO*	Rapportera resultat: Resultat 2
Patient	37,0 eller Undetected	<28,4 eller >35,0	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 >36,0, 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 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.
- Var noga med att sätta reaktionsrören på rätt platser respektive att brunnarna är rätt markerade i programmet.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Tröskelvärdena är endast giltiga om rekommenderade provrör med proppar från Starlab används (art.nr. A1402-3700).

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.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Tröskelvärdena är endast giltiga om rekommenderade provrör med proppar från Starlab används (art.nr. A1402-3700).

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 1.10 eller 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.
- Var noga med att sätta reaktionsrören på rätt platser respektive att brunnarna är rätt markerade i programmet.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Tröskelvärdena är endast giltiga om rekommenderade provrör med proppar från Starlab används (art.nr. A1402-3700).

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

Data över analytiska prestanda för Mx3000-serien

Kitet validerades ursprungligen med Cepheid SmartCycler®. Vissa påståenden om analysens prestanda validerades på nytt på Mx3005P®-plattformen, med användning av en remsa med 8 st 0,2 ml PCR-rör med vidhängande proppar (Star Lab art.nr. A1402-3700) och rapporteras nedan.

Analytisk sensitivitet

Med det ovan beskrivna protokollet för Mx3000-serien 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 med användning av AF293-stammen av *A. fumigatus*.

Reproducerbarhet och repeterbarhet

Reproducerbarhet och repeterbarhet testades av 6 olika operatörer (OP1-6) med 7 olika mallar i triplikat, i totalt 252 analyser. Experimenten utfördes med 1 tillverkningsbatch av MycAssay™ Aspergillus-kit, på 2 olika instrument på 2 olika platser.

Resultaten analyserades med avseende på blankgräns (LoB) och klinisk tröskel (CCO). Vid koncentrationen ~6 gånger detekteringsgränsen (LoD) (~ 150 kopior), överensstämde resultaten från 75% av alla prover (positivt) avseende blankgränsen (LoB), och 67% av proverna var positiva vid CCO. Vid en koncentration på 20 gånger detekteringsgränsen (LoD) (~ 500 kopior), var 92 % av de testade proverna positiva vid CCO. Vid koncentrationer högre än detta överensstämde resultaten från 100 % av alla prover vid såväl CCO som LoB. För negativa mallar var alla testade prover negativa vid CCO.

Mall	OP1	OP2	OP3	OP4	OP5	OP6	Sammantaget
0	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
150	35,9 ± 1,0	35,9 ± 0,7	34,7 ± 0,9	34,9 ± 0,7	36,3 ± 1,1	36,2 ± 0,8	35,7 ± 1,0
500	34,6 ± 0,5	34,7 ± 0,9	33,5 ± 0,7	33,8 ± 0,8	34,9 ± 1,5	34,9 ± 0,4	34,4 ± 1,0
1000	32,5 ± 0,4	32,4 ± 0,4	31,6 ± 0,4	31,9 ± 0,5	32,9 ± 0,6	33,0 ± 0,4	32,4 ± 0,6
1875	31,6 ± 0,3	32,0 ± 0,3	30,8 ± 0,4	31,0 ± 0,6	31,6 ± 0,9	32,7 ± 0,3	31,6 ± 0,8
3750	30,7 ± 0,3	31,1 ± 0,5	29,9 ± 0,2	30,3 ± 0,7	30,6 ± 0,5	31,4 ± 0,3	30,7 ± 0,7
7500	29,7 ± 0,4	29,9 ± 0,4	29,1 ± 0,4	29,5 ± 0,4	29,9 ± 0,8	30,3 ± 0,3	29,7 ± 0,6

Resultat från reproducerbarhetstest med sex operatörer redovisade per antal mallkopior. Panelobjekten (talen i kolumnen är en uppskattning av antalet *Aspergillus*-DNA-kopior/mallpanelobjekt) varierade från 0 kopior till 7500 kopior/reaktion. För varje operatör visar data det genomsnittliga resultatet och standardavvikelsen för sex körningar/panelobjekt. Standardavvikelserna är större för alla operatörer och inom varje operatörs körningar för panelobjekt med lägre antal mallkopior.

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

Den kliniska tröskeln 36,0 hade bestämts för SmartCycler®. Denna tröskel överfördes analytiskt till Mx3000-serieplattformen med en mall med en *Aspergillus*-koncentration som visats ge ≥95 % positiva resultat vid CCO på SmartCycler®. Ct-värdet 36,0 bestämdes, vilket bekräftades med mallar med 3 olika koncentrationer.

Följande påståenden om prestanda bekräftades med Cepheid SmartCycler®**Analytisk specificitet och selektivitet**

Analytisk specificitet testades med DNA som extraherats från 15 olika *Aspergillus*-arter, 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.

Störande ämnen (kontraindikationer mot användning)

Följande substanser testades vid kliniskt relevanta koncentrationer och befanns inte inhibera analysen: acetylcystein, amfotericin, beclometasonpropionat, budesonid, colistimetatnatrium, flutikasonpropionat, formoterolfumaratdehydrat, ipratropiumbromid, lidokain, mannitol, salbutamolsulfat, salmerterol, 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* 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."

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* spp., som inte kan skiljas från *Aspergillus* spp. med detta kit.
- Utvärdering av kliniska prestanda har inte bekräftats med MX3005P®-instrumentet.
- 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.

Mx3000P® och Mx3005P® är registrerade varumärken som tillhör Stratagene. MxPro™ är ett varumärke som tillhör Stratagene.

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

