

MycAssay™ Aspergillus

Roche LightCycler® 2.0

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 diagnosticering av vuxna patienter med misstänkt infektion eller allergi orsakad av *Aspergillus*.

MycAssay™ Aspergillus har validerats för användning med Roche LightCycler® 2.0.

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 antyts¹. 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 aspergilom, 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)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,

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, Tegtmeyer 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, 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

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*-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 *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 är endast avsett att användas med Roche LightCycler® 2.0 och programmet LightCycler® v4.1.
- 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-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.
- 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.

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 (Genomski nlig 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

- Roche LightCycler® 2.0 realtids-PCR-system (inklusive bruksanvisning, tillhörande dator och LightCycler® programversion v4.1)
- LC 2.0 karusellcentrifug (valfria kapillärörsadaptorer för minicentrifug)
- Provkarusell för kapillärör på 20 µL
- LC 2.0 20 µL kapillärör med proppar
- Kapillärörshållare
- Frigöringsverktyg för kapillärör
- Proppningsverktyg
- Mikrocentrifug
- Vortexblandare
- Mikropipetter (volym 7,5 µL – 20 µL)
- Sterila filterspetsar med låg retention
- Engångshandskar, puderfria
- Lösning för DNA-dekontaminering (handelsvara)
- Kit för DNA-isolering (se nedan)
- MycAssay™ CC-kit (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)
- Adapterplatta till vortexblandare (referensnr. 080-015, från Myconostica)

MycAssay Colour Compensation (CC) kit

Exakt analys av data som genererats med MycAssay™ Aspergillus-analysen kräver att en färgkompensationsfil, skapad med Myconostica MycAssay CC-kit [referensnr. 080-080], används. När filen väl skapats kan den användas till flera körningar på samma apparat. Du kan få detaljerad information från din leverantör.

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, avskiljd 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.
- Gör exakta anteckningar i försöksplanen om placeringen av alla kapillär rör som innehåller relevanta prover i 32-positionsskåpen.
- Exakt analys av data kräver att en färgkompensationsfil, skapad med hjälp av Myconostica MycAssay CC-kitet, används.

Procedur för användningen

1. Uppställning av realtids-PCR

- 1.1 Börja med att starta LightCycler® 2.0 realtids-PCR-systemet (instrument, tillhörande dator och centrifug) och det aktuella programmet. Ange användarnamn och lösenord och välj databasen Diagnostic. Om det är första körningen för dagen ska du göra ett självtest på instrumentet innan du ställer in en körning.
- 1.2 **Kom ihåg:** en färgkompensationskörning måste avslutas före analys av resultat för MycAssay™ Aspergillus på LightCycler® 2.0. Denna behöver dock inte utföras före användningen av denna produkt och kan göras och användas på körningsfilerna i efterhand.
- 1.3 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.
- 1.4 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. LightCycler® 2.0 har dock endast plats för upp till 32 prover per körning. Därför kan högst 30 patientprover köras samtidigt (4 påsar).

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.

1.5 Beräkna antalet reaktioner som behövs med hjälp av tabellen nedan.

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

- 1.6 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.
- 1.7 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.**
- 1.8 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 rören botten före användning.
- 1.9 Sätt så många 20 µL kapillär rör i kapillär rörshållaren som behövs. Var noga med att inte lämna några märken på glaset.
- 1.10 Ställ alltid upp den negativa kontrollen först, och sedan patientproverna. Den positiva kontrollen ska alltid ställas upp sist.
- 1.11 Reagens- och DNA-volymer visas i tabellen nedan.

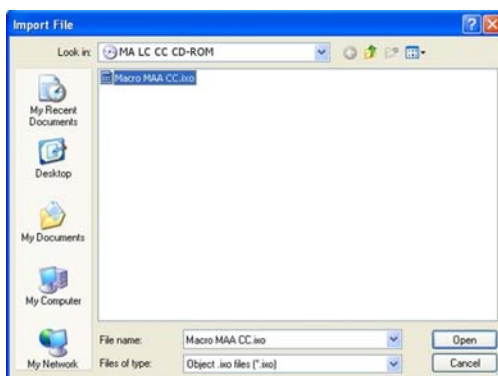
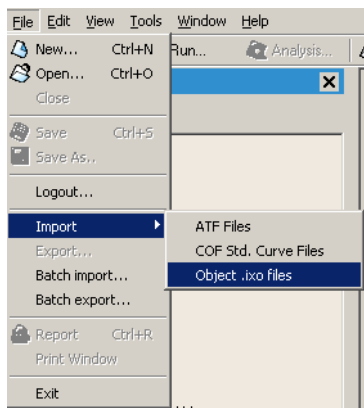
Reagens	Reaktion		
	Negativ kontroll	Patientprover	Positiv kontroll
Rör 1 (orange propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 2 (grön propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 3 (genomskinlig propp)	10 µL	-	-
Patientprover	-	10 µL	-
Rör 4 (svart propp)	-	-	10 µL
Totalvolym	25 µL	25 µL	25 µL

- 1.12 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 klibbig 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.
- 1.13 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.
- 1.14 Var extra noga vid pipettering från Rör 4 (positivt kontroll-DNA) så att det inte kontaminerar någon annan reaktion. Du kan minska risken för korskontaminering om du proppar de övriga kapillär rören innan du öppnar Rör 4.
- 1.15 Med hjälp proppningsverktyget försluter du kapillär rören med de proppar som finns i kapillär rörslådan. Kontrollera att propparna sitter ordentligt i kapillär rören. Om du vill kan du proppa kapillär rören efter att mallen har tillsatts till reaktionen, för att minska risken för kors-/omgivningskontaminering.
- 1.16 Om karusellcentrifugen inte är tillgänglig centrifugerar du proverna i en minicentrifug med de medföljande adaptorerna och en hållare. I annat fall, fortsätt till 1.17.
- 1.17 Flytta mycket försiktigt alla kapillär rör till karusellen i precis samma ordning som de står i hållaren. Börja med det första kapillär röret på plats 1 och fortsätt i stigande följd utan att lämna några luckor. Tryck varje kapillär rör hela vägen ned tills det sitter ordentligt på plats.
- 1.18 Om proverna inte redan centrifugerats enligt punkt 1.16, centrifugerar du proverna i karusellcentrifugen LC 2.0.
- 1.19 Fortsätt omedelbart till Avsnitt 2. MycAssay™ Aspergillus-reaktioner är stabila på bänken i upp till 60 minuter.
- 1.20 Kontrollera efter uppställningen (PCR set-up) att arbetsområdet är noggrant rengjort med DNA-dekontaminerande reagens.

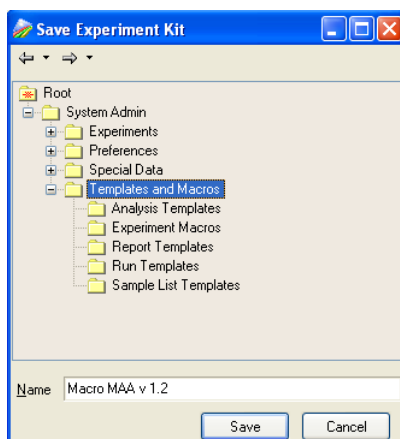
2. Utföra körningen

2.1 Sätt in CD-ROM-skivan **MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol**.

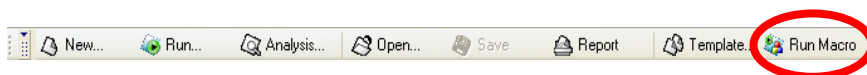
2.2 Gå till **Import** via katalogen **File** och välj **Object .ixo files**. Importera filen **Macro MAA v1.2.ixo** från CD:n till din databas.



2.3 Gå till **Save** via katalogen **File** och spara makromallen på önskad plats i din databas.

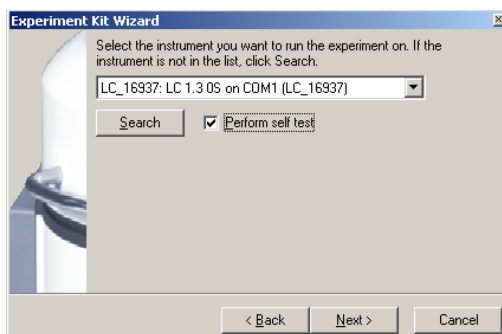


2.4 Välj alternativet **Run Macro** i verktygsfältet.

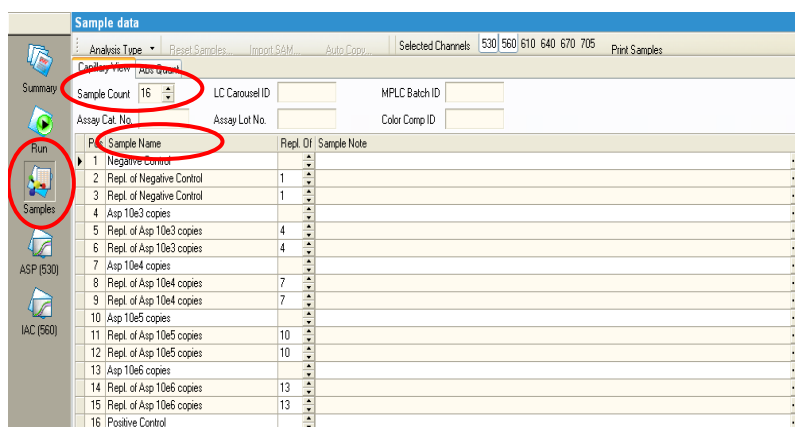


2.5 Välj mallfilen **Macro MAA v1.2** och tryck på **Open**.

2.6 Följ snabbguidens anvisningar. Markera rutan **Perform Self-Test** om detta är dagens första körning.



- 2.7 Ge körningsfilen ett namn och spara den på önskad plats.
- 2.8 Gå till avsnittet **Samples** genom att klicka på fliken till vänster på skärmen. Redigera antalet prover i rutan **Samples Count** och namnen under fliken **Capillary view**. Namnge proverna som i din försöksplan och enligt positionerna i karusellen.



- 2.9 Sätt den centrifugerade karusellen i LC 2.0-instrumentet. Kontrollera att skåran under provplats 1 på karusellen låser sig med stiftet på värmekammaren. Kontrollera att karusellen är ordentligt insatt i kammaren och stäng locket.
- 2.10 När du är klar trycker du på **Start-knappen**. Kontrollera att instrumentet har hittat alla kapilläröror i karusellen och att programmet har startat.

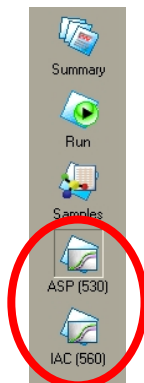


3. Dataanalys och tolkning

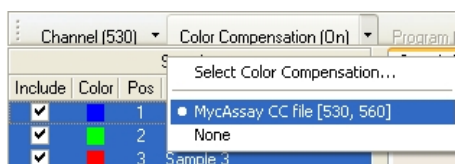
3.2 **Kom ihåg:** ett färgkompensationsobjekt måste användas före analys av resultat för MycAssay™ Aspergillus på LightCycler® 2.0. Om du inte redan har skapat ett så gör du det nu, innan du fortsätter med dataanalysen och tolkningen.

När körningen är klar kontrollerar du innehållet i den rapport som öppnar sig och skriver ut den om du vill.

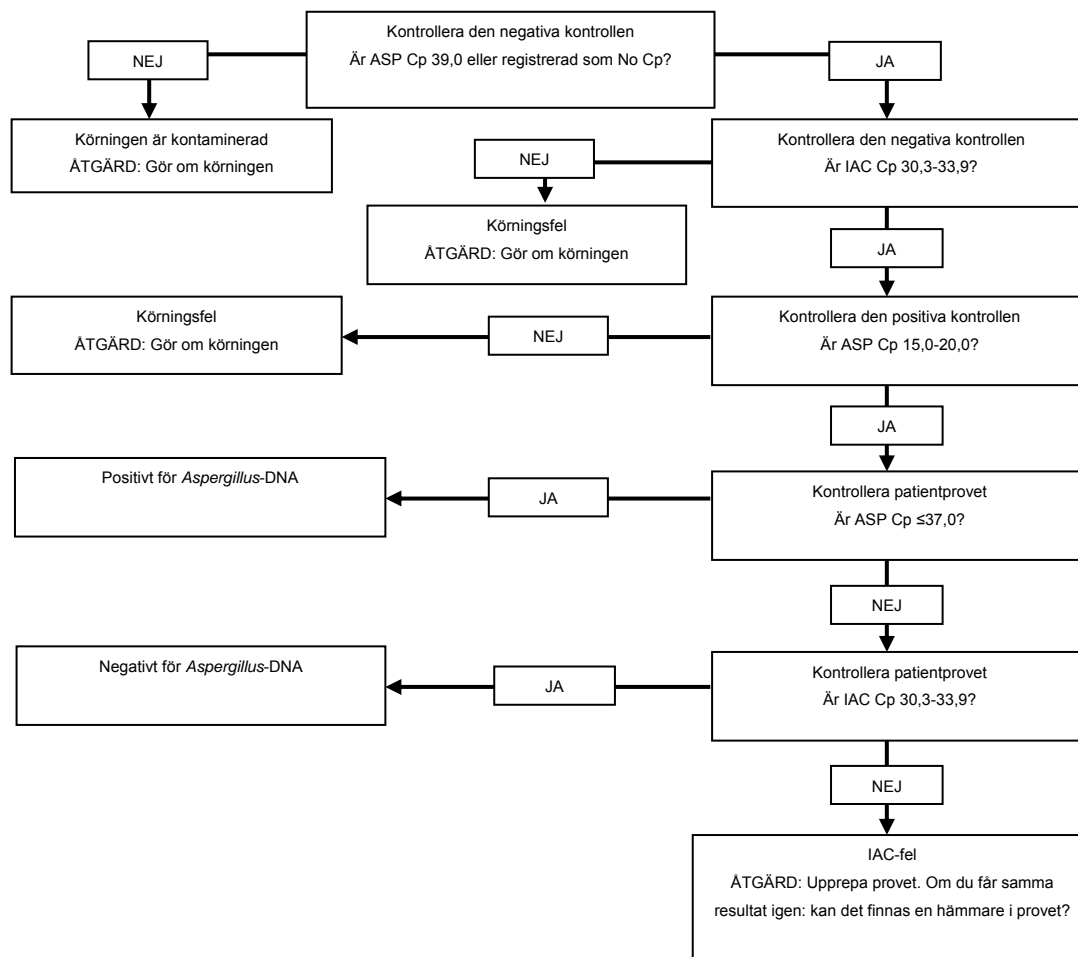
3.3 Aspergillus-resultaten kan ses i **Pathogen (530)**-analyssektionen och IAC-resultaten i **IAC (560)**-analyssektionen.



3.4 I båda sektionerna, **ASP (530)** och **IAC (560)**, väljer du rätt färgkompensationsfil (**MycAssay CC file**) att använda för försöket.



3.5 Analysera varje prov. Börja med kontrollerna enligt flödesschemat nedan (mer information finns även i tabellen under schemat).



Prov	Pathogen (530) Cp	IAC (560) Cp	Tolkning	Åtgärd
Negativ kontroll	39,0 eller No Cp	Inom 30,3-33,9	Acceptabel negativ kontroll	Patientresultat tillförlitliga
Negativ kontroll	39,0 eller No Cp	<30,3 eller >33,9	Fel för negativ kontroll	Upprepa hela körningen
Negativ kontroll	<39,0	Inom 30,3-33,9	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
Patientprov	≥39,0 eller No Cp	Inom 30,3-33,9	Negativt för <i>Aspergillus</i>	Rapportera resultat: Resultat 1
Patientprov	≤37,0	Ej tillämpligt	Positivt för <i>Aspergillus</i>	Rapportera resultat: Resultat 2
Patientprov	39,0 eller No Cp	<30,3 eller >33,9	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 Cp-värden >37,0, men de avspeglar normala nivåer eller bakgrunds nivåer 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 530-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 anteckningarna om kapillärrören är korrekta i programmet.

4.2 Cp-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 vätskenivåer i ett reaktionsrör jämfört med andra.
- Fel CC-fil användes till data.
- Skapa en CC-fil med hjälp av Myconostica MycAssay CC-kitet och använd denna till resultaten och gör om analysen. Du kan få detaljerad information om detta kit från leverantören i ditt område.

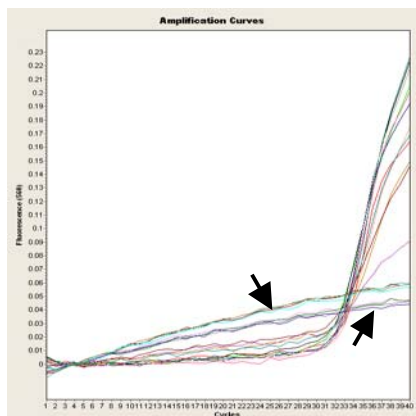
4.3 Den positiva kontrollen är negativ:

- 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 1.11-1.13 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 detta reaktionsrör jämfört med de andra.
- Den positiva kontrollen var felplacerad i instrumentet.
- Kontrollera att anteckningarna om kapillärrören är korrekta i programmet.

4.4 Patientprovet(-proverna) är negativa och IAC ligger utanför tillåtet område (esultat 3):

- Det är troligt att ett eller patientprover innehåller PCR-hämmare.
- Vi rekommenderar att DNA från prover extraheras med kitet MycXtra™ Fungal DNA Extraction kit.

4.5 Patientprovet är negativt i ASP (530)-sektionen och IAC (560)-kurvan avviker anmärkningsvärt från den normala baslinjen (som i nedanstående bildexempel; pilarna visar onormala kurvor):



▪ **PCR-reaktionen hämmades.**

→ Kontrollera nogga att arbetsområdet och instrumenten är helt torra efter dekontamineringen före PCR-uppställningen.

→ Kör patientprovet en gång till. Om problemet upprepas finns det PCR-hämmare i provet. Rapportera provet som Undetermined.

4.6 Resultaten i IAC (560)-sektionen är nästan exakt likadana som resultaten i Pathogen (530)-sektionen.

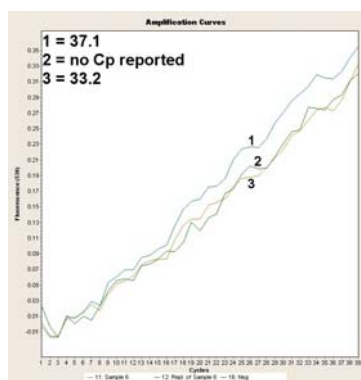
▪ Ingen eller fel färgkompensationsfil användes till försöksresultaten.

→ I båda analyssektionerna ska du markera om färgkompensationen är ON (på) och att samma MycAssay CC-fil används för båda kanalerna.

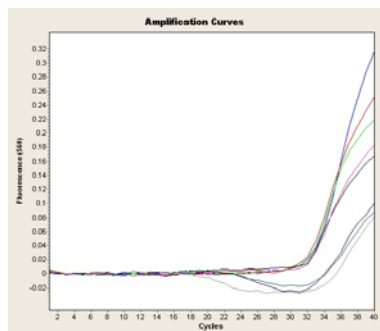
4.7 Baslinjen för vissa prover är densamma som för den negativa kontrollen, vilket tyder på att ingen amplifiering har skett. Programmet har dock rapporterat ett positivt Cp-värde (som i nedanstående figur):

▪ Ett positivt Cp-värde för en negativ amplifieringskurva observerades endast två gånger på 154 negativa reaktioner utförda under valideringsstudierna.

→ Om detta inträffar upprepar du provet/proverna för att bekräfta resultatet *Negative*.



4.8 När jag använder mitt CC-objekt bildas en sänkning för vissa data i 560 IAC-kanalen, vilket leder till Cp-värden utanför det godkända området:



- Detta är helt normalt för reaktioner som innehåller höga koncentrationer av mål-DNA och stör inte tolkningen av patientresultaten.
- Följ den normala analysen; du upptäcker att för prover som är positiva för Aspergillus, krävs inget IAC-resultat för ett resultatbeslut för patienten.

4.9 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 utgången 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. Only the file appropriate to the software can be loaded. Repeat the run using the correct protocol file.

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

Egenskaper och begränsningar

Kitet validerades ursprungligen med Cepheid SmartCycler®. Vissa påståenden om analysens prestanda omvaliderades på LightCycler® 2.0-plattformen med 20 µL kapillärrör av glas (Roche, artikelnr. 04929292001 eller 11909339001), och rapporteras nedan. Där skillnaderna mellan plattformarna inte förväntades påverka analysens prestanda och därmed vad som hävdas, upprepades inte studien. Sådana resultat från SmartCycler® anses överförbara till plattformen LightCycler® 2.0.

Analytisk sensitivitet

Med det ovan beskrivna protokollet för LightCycler® 2.0 och PCR-mallar skapade av Myconostica, bestämdes blankgränsen (Limit of Blank, LoB) för MycAssay™ Aspergillus till Cp=39,0, medan detekteringsgränsen (Limit of Detection, LoD) bestämdes till <25 kopior av mål-DNA med användning av AF293-stammen av *A. fumigatus*.

Analytisk selektivitet

Genomiskt DNA extraherat från *Penicillium* spp. ger 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 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 meningitides, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius.

Humant DNA och följande tre arter: *Pneumocystis jirovecii, Histoplasma capsulatum* och *Alternaria alternata*, testades inte med LightCycler® 2.0-systemet, utan testades tidigare med SmartCycler®. Alla fyra gav negativa resultat med 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 6 gånger detekteringsgränsen (LoD), överensstämde resultaten från 100 % av alla prover (positivt) avseende blankgränsen (LoB), och 87,5% av proverna överensstämde avseende CCO. Vid koncentrationer högre än 6 x LoD överensstämde resultaten från 100 % av alla prover för såväl CCO som LoB.

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

Den kliniska tröskeln 36,0 hade bestämts för SmartCycler®. Denna tröskel övrefördes analytiskt till LightCycler® 2.0-plattformen med en mall med en *Aspergillus*-koncentration som visats ge ≥ 95 % positiva resultat vid CCO på SmartCycler®. Ett Cp-värde på 37,0 bestämdes, vilket bekräftades med mallar med 3 olika koncentrationer.

Följande påståenden om prestanda bekräftades med 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, 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.
- 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.

LightCycler® är ett registrerat varumärke som tillhör Roche Diagnostics, GmbH.



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

