

# MycAssay™ Aspergillus Cepheid SmartCycler® Serum REF 080-045

## Uso previsto

MycAssay™ Aspergillus è studiato per l'uso presso laboratori professionali qualificati per la determinazione qualitativa del DNA genomico di *Aspergillus* spp. estratto dal siero come ausilio alla diagnosi dell'aspergillosi polmonare.

MycAssay™ Aspergillus (SERUM) è stato convalidato per l'uso con il sistema Cepheid SmartCycler® (che utilizza le versioni 1.7b e 3.0 del software Dx).

## Introduzione e spiegazione

Con il termine *Aspergillus* spp. si identificano funghi opportunistici ubiquitari, che causano sindromi allergiche e invasive. Il genere comprende all'incirca 300 specie, di cui 41 sono state associate a malattie umane. La maggior parte delle malattie è causata da *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger*, con minore frequenza sono state imputate infezioni a *A. nidulans* e ad altre rare specie come *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. lentulus* e *A. pseudofischeri*<sup>1</sup>. Gran parte delle malattie causate da *Aspergillus* spp. interessa le vie respiratorie. L'aspergillosi invasiva (AI) insorge in gruppi di pazienti a rischio, fra cui i pazienti trattati per la leucemia e i linfomi, i pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) e di organi solidi, nonché i pazienti trattati con corticosteroidi e quelli affetti da neutropenia o disfunzione dei fagociti (ad es. malattia granulomatosa cronica e infezione HIV).

I tassi delle malattie fungine invasive (MFI) sono all'incirca sette volte superiori nei pazienti che hanno subito un trapianto di CSE allogeniche rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto autologo; l'aspergillosi invasiva (AI) è responsabile di quasi metà delle infezioni<sup>2</sup>. Nei pazienti sottoposti a trapianto di CSE autologhe l'aspergillosi è limitata in gran parte alla fase neutropenica post-trapianto. Viceversa, i pazienti sottoposti a trapianto di CSE allogeniche sono a rischio di aspergillosi invasiva per periodi più prolungati, addirittura fino a od oltre 100 giorni dopo il trapianto, a causa della maggiore frequenza di GvHD (malattia del trapianto contro l'ospite) e del lento recupero della conta dei linfociti T. Nei pazienti trattati con chemioterapia per leucemia acuta o con regimi di salvataggio per leucemia o linfomi recidivati, l'AI è una delle principali cause di morte.

Le definizioni unanime delle malattie fungine invasive sono state revisionate e pubblicate dall'Organizzazione Europea per la Ricerca e la Cura del Cancro (EORTC) e dal Gruppo di Studio delle Micosi (MSG) e hanno incluso i criteri stabiliti per la diagnosi dell'AI dimostrata, probabile e possibile nei pazienti con tumori maligni ematologici o sottoposti a trapianto di CSE<sup>3</sup>. Attualmente, i criteri stabiliti per l'AI probabile sono un fattore ospite più un criterio clinico più un test microbiologico. La diagnosi per l'AI possibile non richiede un criterio microbiologico. I test microbiologici accettati nei criteri dell'AI probabile includono un test ELISA basato sul siero, che rileva la presenza di galattomannano (GM). I galattomannani sono polisaccaridi che vengono rilasciati in misura proporzionale alla crescita del fungo *Aspergillus*. Nel siero di pazienti adulti che non ricevono una profilassi con azoli attivi contro le muffe, il test ha una sensibilità del 79,3% (I.C. del 95% dal 61,6 al 90,2%) e una specificità dell'88,8% (I.C. del 95% dall'82,6 al 93,0%)<sup>4</sup>. Per migliorare la precisione diagnostica si raccomandano due test GM-positivi consecutivi.

Una meta-analisi di Mengoli et al ha riportato i risultati di >10.000 campioni di sangue, siero e plasma di 1618 pazienti a rischio per AI. La sensibilità e la specificità di un singolo campione di sangue PCR-positivo sono risultate pari rispettivamente a 0,88 (I.C. del 95% dallo 0,75 allo 0,94%) e a 0,75 (I.C. del 95% dallo 0,63 allo 0,84%) e l'odds ratio per i casi dimostrati e probabili è risultato pari a 16,41 (I.C. del 95% dal 6,43 al 41,88%)<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Database delle specie in [www.aspergillus.org.uk](http://www.aspergillus.org.uk)

<sup>2</sup> Kontoyiannis DP et al Clin Infect Dis 2010; 50(8); 1091-1100

<sup>3</sup> Ascioğlu S et al Clin Infect Dis 2002; 34; 7-14

<sup>4</sup> Informazioni sul test Platelia *Aspergillus* EIA della BioRad

<sup>5</sup> Mengoli C. et al The Lancet ID 2009; 9; 86-96

MycAssay™ *Aspergillus* è un kit diagnostico molecolare per la determinazione del DNA genomico di *Aspergillus* utilizzando la tecnica Real-Time PCR con sonde Molecular Beacons<sup>6</sup>. L'intera procedura di analisi, compresa l'estrazione del DNA dal campione clinico, può essere completata in 4 ore, contrariamente alla coltura fungina, che richiede diversi giorni per dare risultati positivi. Questo test offre vantaggi rispetto ai metodi diagnostici attualmente disponibili per l'aspergillosi invasiva acuta e polmonare cronica, fra cui una più rapida determinazione dell'*Aspergillus* spp. e una potenziale aumentata sensibilità per l'*Aspergillus* spp. in pazienti fortemente immunocompromessi con presunta aspergillosi polmonare invasiva.

## Principi della procedura

Dopo aver miscelato i reagenti del kit MycAssay™ *Aspergillus* con un campione contenente la sequenza di DNA bersaglio di *Aspergillus* (una porzione del gene ribosomiale 18S di *Aspergillus*), il ciclo termico produce l'amplificazione del DNA. Il test contiene inoltre un Controllo di Amplificazione Interno (IAC), un frammento di DNA non presente nelle specie di *Aspergillus* e altri genomi fungini, batterici o umani, per individuare sostanze inibitorie della PCR e confermare la funzionalità dei reagenti del test.

I bersagli di DNA amplificati sono individuati con la tecnologia delle sonde Molecular Beacons. Le Molecular Beacons sono sonde di ibridazione oligonucleotidiche a singolo filamento, che formano una struttura "stem-and-loop". Il loop (porzione ad anello) contiene una sequenza della sonda complementare alla sequenza bersaglio, mentre lo stem (porzione a colletto) è formato da due sequenze complementari appaiate, disposte su entrambi i lati della sequenza della sonda. Un fluorocromo, che emette luce fluorescente se eccitato da luce a lunghezza d'onda adeguata, viene legato in modo covalente ad un'estremità, mentre un quencher, che sopprime la fluorescenza del fluorocromo se vi si trova fisicamente vicino, viene legato in modo covalente all'altra estremità. Le sonde Molecular Beacons non emettono luce fluorescente quando sono libere in soluzione. Tuttavia, quando ibridano con un filamento di acido nucleico contenente una sequenza bersaglio, subiscono una trasformazione conformazionale che separa fisicamente il fluorocromo e il quencher consentendo loro di emettere luce fluorescente se eccitati. La quantità di fluorescenza in un dato ciclo, o nel ciclo successivo, dipende dalla quantità di ampliconi specifici presenti in quel momento. Il sistema Real-Time PCR monitora simultaneamente la fluorescenza emessa da ogni beacon.

## Precauzioni

- Il kit è studiato per l'uso esclusivamente presso laboratori professionali. Sono richieste procedure particolari per la manipolazione dei campioni in modo da prevenire la formazione di aerosol. Nella manipolazione dei campioni vanno rispettate precauzioni standard e norme istituzionali. Myconostica Ltd. mette a disposizione su richiesta la scheda di sicurezza del prodotto.
- Questo test è previsto esclusivamente per l'uso diagnostico *in vitro*.
- In studi di convalida analitica, livelli di transaminasi pari a 22,2 U per 0,5 mL di siero hanno dimostrato di avere un possibile effetto di degradazione sul DNA di *Aspergillus*.
- Questo test è stato valutato con siero raccolto in provette per siero Greiner con tappo rosso. Altre provette per siero/sangue possono contenere sostanze inibitorie o competitive che non sono state testate.
- Questo test è stato convalidato per campioni di siero. Non sono disponibili dati di convalida per il plasma o il sangue intero.
- Questo test deve essere utilizzato esclusivamente con il sistema Cepheid SmartCycler® con il Software Diagnostico Dx, versioni 1.7b e 3.0.
- Non utilizzare i reagenti o i controlli se le buste protettive sono aperte o danneggiate al relativo ricevimento.
- I reagenti e i controlli non sono intercambiabili fra i kit di diversi lotti.
- Non creare mai pool di reagenti o controlli di diverse provette, anche se appartengono allo stesso lotto.
- Non utilizzare mai i reagenti o i controlli dopo la data di scadenza.
- Accertarsi che tutti i reagenti utilizzati siano privi di contaminazione fungina.
- I reagenti e i controlli non devono essere ricongelati o riutilizzati dopo l'apertura.
- Indossare indumenti protettivi e guanti monouso per manipolare i reagenti del kit.
- Evitare la contaminazione microbica e da deossiribonucleasi (DNAsi) dei reagenti durante il prelievo di aliquote dalle provette.
- Si raccomanda l'impiego di puntali con filtro monouso, a bassa ritenzione, esenti da DNAsi e sterili, oppure puntali per pipetta a spostamento positivo.
- Utilizzare un nuovo puntale per ogni campione o reagente.
- Smaltire i reagenti non utilizzati e i materiali di scarto in conformità con le normative nazionali, federali, statali e locali.

<sup>6</sup> Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology; 14: 303-308.

- Per evitare la contaminazione da ampliconi di *Aspergillus* o IAC, non aprire le provette di reazione dopo l'amplificazione.
- Possono essere testate ulteriori sostanze di controllo in conformità con le direttive o le normative di organizzazioni locali, statali, provinciali, federali o di enti di certificazione.
- Non mangiare, bere o fumare nei locali dove vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
- Il siero può essere conservato fino a 48 ore in refrigeratore (2-8°C) o congelatore (da -15 a -25°C).
- Basse concentrazioni di DNA possono risultare instabili se non conservate correttamente. Si raccomanda di conservare le estrazioni del DNA dai campioni clinici a -80°C per preservarne l'integrità. Se possibile, si raccomanda inoltre di evitare molteplici cicli di scongelamento e ricongelamento.

## Contenuto del kit

### Descrizione

Il kit è costituito da cinque buste di alluminio sigillate a 3 scomparti, ciascuna delle quali può essere prelevata singolarmente dalla confezione e utilizzata separatamente. Ogni busta contiene reagenti sufficienti per 8 reazioni.

	<u>Volume</u>
<b>Provetta 1</b> dNTP (Cappuccio arancione) MgCl <sub>2</sub> Soluzione tamponata di complesso DNA-polimerasi	66 µL
<b>Provetta 2</b> Primer < 0,01% (Cappuccio verde) Sonde Molecular Beacons < 0,01% Controllo di Amplificazione Interno (IAC) <0,0001% Il Controllo di Amplificazione Interno è un DNA plasmidico ricombinante contenente una sequenza non infettiva senza legami con la sequenza bersaglio (di <i>Aspergillus</i> ). Tampone Tris-HCl	66 µL
<b>Provetta 3</b> Controllo negativo (Cappuccio trasparente) Acqua	25 µL
<b>Provetta 4</b> Controllo positivo (Cappuccio nero) DNA di controllo positivo < 0,0001% La molecola del controllo positivo è un plasmide ricombinante contenente la sequenza bersaglio di <i>Aspergillus</i> . Tampone Tris-HCl	25 µL

Il kit contiene inoltre:

- CD-ROM del protocollo Myconostica MycAssay™ *Aspergillus*
- Istruzioni per l'uso
- Certificato di analisi

## Conservazione

Il kit deve essere conservato congelato (fra -15 e -25°C) fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta applicata sulla confezione. Alla scadenza il kit deve essere smaltito in conformità con le normative locali.

Una volta aperta una busta, il relativo contenuto deve essere utilizzato immediatamente. Non ricongelare né riutilizzare successivamente.

## Materiale occorrente, ma non fornito

### A. Materiale occorrente

- Sistema SmartCycler® Real-Time PCR (incluso il manuale d'uso, il computer collegato e il Software Dx dello SmartCycler®, versione 3.0 o 1.7b)
- Provette di reazione SmartCycler®
- Minicentrifuga adatta per le provette di reazione SmartCycler®

- Rack in plastica per provette di reazione SmartCycler®

## B. Materiale occorrente in generale

- Microcentrifuga
- Agitatore tipo Vortex
- Micropipette (volumi necessari 7,5 µL - 20 µL)
- Puntali con filtro a bassa ritenzione, sterili
- Guasti monouso, non talcati
- Soluzione decontaminante proprietaria per rimuovere contaminazioni da DNA
- Pennarello indelebile
- Kit di isolamento del DNA (vedere di seguito)

## Campioni

I campioni per il test MycAssay™ Aspergillus sono costituiti dal DNA genomico totale estratto da campioni sierici. Per l'estrazione si raccomanda l'impiego del kit e dell'apparecchiatura di seguito indicati, utilizzati anche per la procedura di convalida:

- Kit di estrazione manuale del DNA High Pure (Roche Diagnostics cat. n° 11 796 828 001)
- Soluzione di proteinasi K (Sigma Aldrich Chemicals cat. n° P4850-5ML)
- 2-propanolo (Sigma Aldrich Chemicals cat. n° 19516-25ML)
- Agitatore Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Piastra adattatore per agitatore Vortex (Art. n°: 080-015 disponibile presso Myconostica)

## Note sulla procedura

- Prima di cominciare, leggere integralmente il protocollo.
- L'intero processo di analisi con MycAssay™ Aspergillus (inclusa l'estrazione del DNA) dura all'incirca 2 ore e ½, a seconda del numero di campioni testati.
- La preparazione del test deve essere eseguita in una stazione di lavoro PCR o in un'area di laboratorio pre-PCR. Se non è disponibile una stazione di lavoro PCR, il test deve essere preparato in un'area dedicata del laboratorio<sup>7</sup>, che sia separata dalle aree utilizzate per l'estrazione del DNA e che venga pulita regolarmente con agenti decontaminanti contro il DNA.
- Evitare, tuttavia, di utilizzare agenti decontaminanti contro il DNA quando si prepara il dosaggio Real-Time PCR, perché possono inibire il test.
- Utilizzare micropipette per trasferire i fluidi. Utilizzare micropipette dedicate per la preparazione di queste reazioni e sottoporle a regolare decontaminazione.
- Si raccomanda di utilizzare puntali con filtro a bassa ritenzione per accertarsi che non vada perso DNA durante la procedura di preparazione.
- **Manipolare con cautela la Provetta 4, perchè contiene il DNA di controllo positivo e un'eventuale contaminazione potrebbe causare risultati di analisi falsamente positivi.**
- Indossare sempre guanti protettivi.
- Tutte le provette dei reagenti devono essere chiuse con i rispettivi cappucci dopo l'uso e prima dello smaltimento.
- Accertarsi di identificare correttamente le provette di reazione SmartCycler® quando si analizzano più campioni di pazienti.
- Prestare attenzione quando si seleziona il file del protocollo: selezionare **SERUM MycAssay Asp v1**. NON selezionare **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3** o **MycAssay Aspergillus v1\_3**.

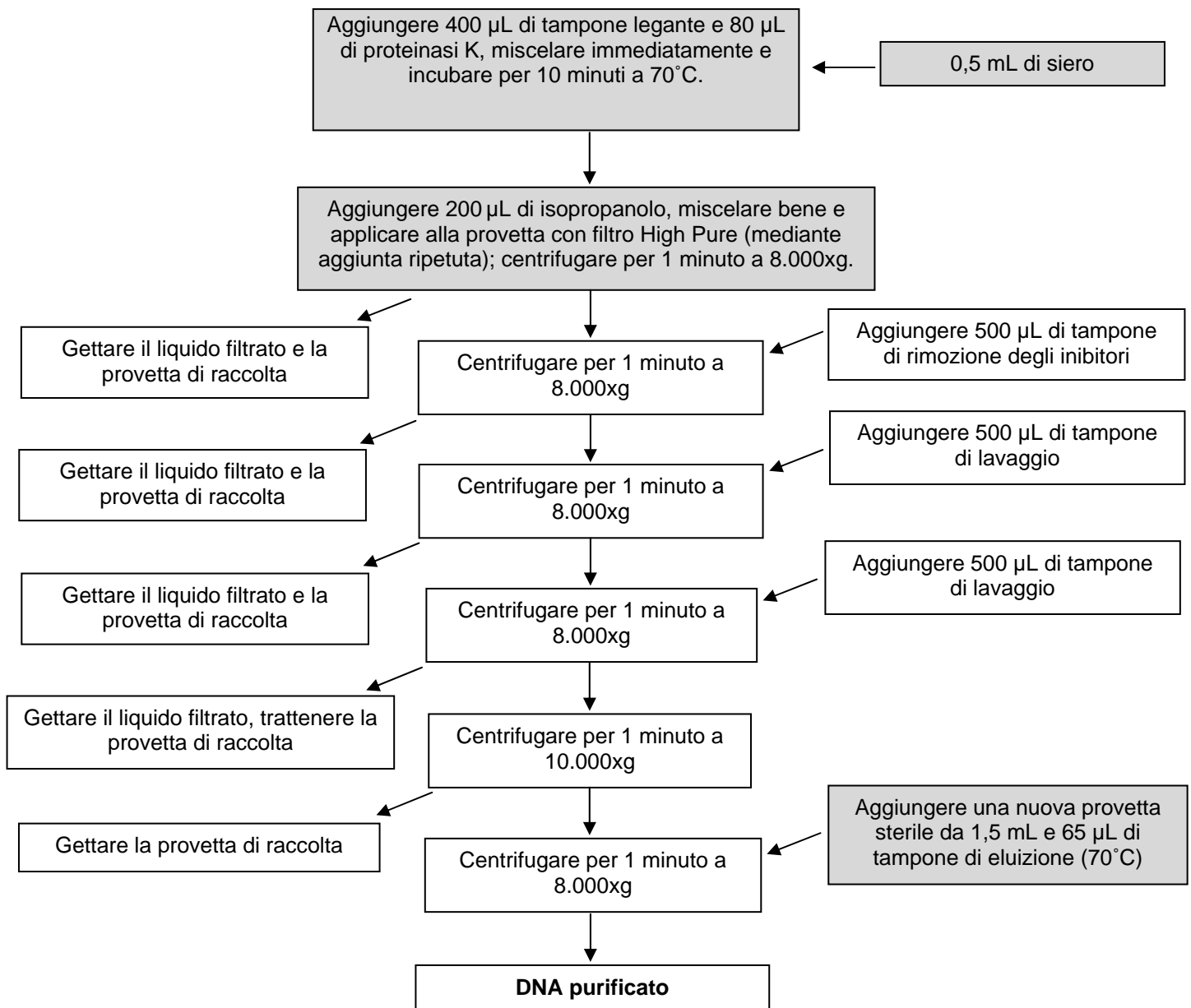
## Procedura per l'uso

La procedura prevede 2 fasi, l'estrazione del DNA dal siero e la quantificazione mediante Real-Time PCR. L'estrazione del DNA avviene mediante l'“High Pure PCR Template Preparation Kit” di Roche. L'“High Pure PCR Template Preparation Kit” è studiato per purificare gli acidi nucleici da un'ampia gamma di tipologie di campioni. Il protocollo di estrazione illustrato nelle presenti istruzioni per l'uso è stato ottimizzato per isolare il DNA di *Aspergillus* spp dal siero ed è adatto per essere utilizzato con il kit MycAssay™ Aspergillus Serum.

<sup>7</sup> Vedere ad esempio Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. In PCR Primer, 2nd Ed. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

NOTA IMPORTANTE: le istruzioni del produttore sono state modificate per migliorare la resa del DNA estratto da un campione sierico e la sensibilità del test. Alcuni reagenti specificati nelle fasi 1 e 2 della Sezione 2.3 nelle istruzioni per l'uso dell'“High Pure PCR Template Preparation Kit” si esauriranno prima di altri, pertanto dovranno essere sostituiti. Durante il processo di convalida è stata utilizzata la proteinasi K di Sigma Aldrich.

**Protocollo di estrazione – le caselle ombreggiate identificano le fasi che sono state modificate rispetto alle istruzioni del produttore.**



**1. Preparazione del dosaggio Real-Time PCR**

- 1.1 Per cominciare accendere il sistema Real-Time PCR (strumento e computer associato) e lanciare il software corrispondente. Inserire i nomi utente e le password necessari.
- 1.2 Accertarsi che l'area di lavoro sia stata pulita con agenti decontaminanti contro il DNA e che sia perfettamente asciutta; evitare però di utilizzare questi agenti durante la preparazione del dosaggio, perché un'eccessiva quantità di soluzione decontaminante può inibire le reazioni PCR.
- 1.3 Una busta contiene rispettivamente una Provetta 1, una Provetta 2, una Provetta 3 e una Provetta 4. I reagenti di una busta sono sufficienti per eseguire 8 reazioni. Occorre includere almeno un controllo positivo e un controllo negativo in ogni analisi con i reagenti dello stesso lotto. Una busta consente quindi di analizzare 6 campioni di pazienti. Per analizzare più di 6 campioni è possibile utilizzare più buste, a condizione che le buste utilizzate appartengano allo stesso lotto. Utilizzando le 5 buste di un lotto è possibile analizzare al massimo 38 campioni di pazienti.
- 1.4 Calcolare il numero di reazioni necessarie facendo riferimento alla seguente tabella:

Numero di buste	Numero massimo di campioni di pazienti
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

- 1.5 Togliere dal congelatore il numero adeguato di buste. Non utilizzare le buste che non sono più sigillate. Se i campioni dei pazienti sono stati congelati dopo l'estrazione, rimuovere anche questi dal congelatore.
- 1.6 Aprire il numero necessario di buste ed estrarre le provette. Se si utilizzano più buste, ma si include un solo set di controlli positivi e negativi, è necessario estrarre la Provetta 3 e la Provetta 4 da una sola busta. **Manipolare con cautela la Provetta 4, perchè contiene il DNA di controllo positivo e un'eventuale contaminazione potrebbe causare risultati di analisi falsamente positivi.**
- 1.7 Far scongelare il contenuto delle provette collocandole sul banco di laboratorio per 5-10 minuti, e accertarsi che il contenuto di ogni provetta sia completamente scongelato prima di procedere. Miscelare nell'agitatore Vortex il contenuto delle provette e i campioni dei pazienti, quindi centrifugarli brevemente in una microcentrifuga affinché tutto il contenuto si raccolga sul fondo delle provette prima dell'uso.
- 1.8 Collocare il numero necessario di provette di reazione SmartCycler® sul/i rispettivo/i rack. Accertarsi di toccare con le mani solo il collo delle provette di reazione.
- 1.9 Preparare sempre prima il controllo negativo, seguito dai campioni dei pazienti. Il controllo positivo deve essere preparato sempre per ultimo.
- 1.10 I volumi dei reagenti e del DNA sono indicati nella tabella sottostante:

Reagente	Reazione		
	Controllo negativo	Campione del paziente	Controllo positivo
<b>Provetta 1 (cappuccio arancione)</b>	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
<b>Provetta 2 (cappuccio verde)</b>	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
<b>Provetta 3 (cappuccio trasparente)</b>	10 µL	-	-
<b>Campione del paziente</b>	-	10 µL	-
<b>Provetta 4 (cappuccio nero)</b>	-	-	10 µL
Volume totale	25 µL	25 µL	25 µL

- 1.11 Aggiungere i reagenti nell'ordine indicato in tabella: Provetta 1, quindi Provetta 2, poi il template (controllo negativo, campione del paziente o controllo positivo). Prestare attenzione quando si prelevano le aliquote della Provetta 1; il liquido è leggermente viscoso e può aderire al bordo interno della provetta. Se ciò accade, centrifugare di nuovo la provetta per raccogliere il restante contenuto sul fondo prima di cercare di rimuovere le aliquote finali.

- 1.12 Utilizzare un nuovo puntale per ogni trasferimento di liquido. Dopo l'uso, chiudere ogni provetta del reagente utilizzato e gettarla immediatamente con il contenuto eventualmente rimasto in un contenitore per rifiuti clinici sigillabile. I reagenti non utilizzati non possono essere conservati per usi futuri.
- 1.13 Osservare estrema cautela durante la dispensazione della Provetta 4 (contenente il DNA di controllo positivo) per accertarsi che non contaminino altre provette di reazione. Chiudendo i cappucci delle altre provette di reazione prima di aprire la Provetta 4 si può ridurre il rischio di contaminazione crociata.
- 1.14 Accertarsi che tutti i cappucci delle provette di reazione siano perfettamente chiusi, quindi marcare ogni cappuccio con un pennarello indelebile, ad es. POS per controllo positivo, NEG per controllo negativo e l'ID del paziente sui rispettivi campioni. Centrifugare le provette di reazione per 10 secondi utilizzando la minicentrifuga appositamente prevista. Controllare visivamente che non vi siano bolle d'aria nei miscugli di reazione.
- 1.15 Passare immediatamente alla Sezione 2. Le reazioni di MycAssay™ Aspergillus sono stabili sul banco di laboratorio per 60 minuti.
- 1.16 Dopo la preparazione del dosaggio PCR accertarsi che l'area di lavoro venga accuratamente pulita utilizzando agenti decontaminanti contro il DNA.

## 2. Esecuzione dell'analisi

Prima di procedere con la sezione successiva si prega di verificare la versione del Software Dx installata sul proprio computer. Aprire il software, selezionare **Help** dalla toolbar, quindi cliccare su **About**.

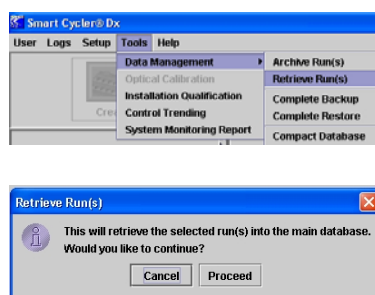
Per la versione 1.7b seguire le istruzioni riportate nella Sezione 2.1.

Per la versione 3.0 seguire le istruzioni riportate nella Sezione 2.2.

Si noti inoltre che il software richiede determinati privilegi dell'utente per eseguire le funzioni **Retrieve Run(s)** o **Import** di un test. Questi privilegi possono essere assegnati solo dall'**amministratore** dello strumento.

### 2.1 Software Diagnostico Dx dello SmartCycler®, versione 1.7b

- 2.1.1 Aprire il Software Diagnostico Dx dello SmartCycler®, versione 1.7b, e inserire nome utente e password.
- 2.1.2 Inserire il **MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol CD-ROM** e cliccare sul tab **Define Assays**.
- 2.1.3 Tramite la directory **Tools** nella barra del menu in alto selezionare **Retrieve Run(s)** e cliccare su **Proceed**:



- 2.1.4 Selezionare il file **SERUM MycAssay Asp v1.DXA** dal CD-ROM. AVVERTENZA: questo file è uno dei due riconosciuti dal software; accertarsi di aver selezionato il file corretto.
- 2.1.5 Nella videata successiva selezionare il nome del file **SERUM MycAssay Asp. v1** e cliccare su **OK**, poi su **Proceed** e ancora su **OK**.
- 2.1.6 Chiudere il software. Riaprendo il software, si potrà utilizzare il test **SERUM MycAssay Asp v1** per creare una nuova analisi.
- 2.1.7 Cliccare sul tab **Create Run**. Inserire un **Run Name** adeguato (il nome dell'analisi dovrebbe includere almeno la data e le iniziali dell'operatore) oppure lasciare vuoto lo spazio se si desidera che il nome venga creato automaticamente dal software.
- 2.1.8 Selezionare **SERUM MycAssay Asp v1** come test.
- 2.1.9 Inserire il **Lot Number** e la **Expiration Date** del kit stampati sulla confezione e su ogni busta. Il numero di lotto è riportato nella forma M-XXXXXXXX.
- 2.1.10 Inserire il numero di campioni nella casella **Number of specimens** e cliccare su **Apply**. Il software assegna automaticamente il nome **SPEC** al **Sample ID** di ogni campione. Per questo motivo occorre rinominare

opportunamente ogni sito a scopo di identificazione. A tal fine fare doppio clic su **SPEC** per selezionarlo, quindi digitare l'ID del campione.

Il software include automaticamente un controllo negativo e un controllo positivo nell'analisi Real-Time PCR.

- 2.1.11 Collocare con cautela le provette di reazione nei previsti siti sul blocco SmartCycler® e cliccare su **Start Run**. N.B. Eseguire questa operazione con molta attenzione, poiché si potrebbe inavvertitamente invertire l'ordine delle provette definito in fase di preparazione. Annotare il nome dell'analisi e cliccare su **OK**. A questo punto ha inizio l'analisi e sopra ogni sito in uso sul blocco si accende una corrispondente luce rossa.
- 2.1.12 Per calcolare quanto tempo durerà l'analisi, cliccare sul tab **Check Status**. Verranno elencati il nome dell'analisi e la corrispondente durata.

## 2.2 Software Diagnostico Dx dello SmartCycler®, versione 3.0

- 2.2.1 Aprire il Software Diagnostico Dx SmartCycler®, versione 3.0, e inserire nome utente e password.
- 2.2.2 Inserire il **MycAssay Aspergillus Myconostica Protocol CD-ROM** e cliccare sul tab **Define Assays**, quindi su **Import** per importare il file **SERUM MycAssay Asp v1.sca** dal CD-ROM. AVVERTENZA: questo file è uno dei due riconosciuti dal software; accertarsi di aver selezionato il file corretto.
- 2.2.3 Cliccare sul tab **Create Run**. Inserire un **Run Name** adeguato (il nome dell'analisi dovrebbe includere almeno la data e le iniziali dell'operatore) oppure lasciare vuoto lo spazio se si desidera che il nome venga creato automaticamente dal software.
- 2.2.4 Selezionare **SERUM MycAssay Asp v1** come test.
- 2.2.5 Inserire il **Lot Number** e la **Expiration Date** del kit stampati sulla confezione e su ogni busta. Il numero di lotto è riportato nella forma M-XXXXXXXX.
- 2.2.6 Inserire l'ID del campione del paziente nella casella **Patient (Sample) ID** e il numero di campioni nella casella **Number of specimens** (repliche) e cliccare su **Apply**. Procedere in questo modo per tutti i campioni dei pazienti da analizzare. Il software include automaticamente un controllo negativo e un controllo positivo nell'analisi Real-Time PCR.
- 2.2.7 Collocare con cautela le provette di reazione nei previsti siti sul blocco SmartCycler® e cliccare su **Start Run**. N.B. Eseguire questa operazione con molta attenzione, poiché si potrebbe inavvertitamente invertire l'ordine delle provette definito in fase di preparazione. Annotare il nome dell'analisi e cliccare su **OK**. A questo punto ha inizio l'analisi e sopra ogni sito in uso sul blocco si accende una corrispondente luce rossa.
- 2.2.8 Per calcolare quanto tempo durerà l'analisi, cliccare sul tab **Check Status**. Verranno elencati il nome dell'analisi e la corrispondente durata.

## 3. Analisi e interpretazione dei dati

- 3.1 I risultati possono essere visualizzati nel Software Dx selezionando il tab **View Results**.
- 3.2 Cliccare sul pulsante **View Another Run** in fondo alla pagina, selezionare l'analisi che si desidera visualizzare e cliccare su **OK**.
- 3.3 I **Patient Results** dovrebbero essere già selezionati nell'elenco **Views**. L'ID (campione) del paziente e il corrispondente risultato del test vengono elencati in modo chiaro. I risultati possono essere interpretati utilizzando la seguente tabella:

Esito	Risultato paziente	Colore	Interpretazione	Ulteriori azioni
1	Negative	Verde	Negativo per l' <i>Aspergillus</i>	Riportare il risultato.
2	Positive	Rosso	Positivo per l' <i>Aspergillus</i>	Riportare il risultato.
3	Invalid	Grigio chiaro*	Errore IAC nel campione	Ripetere l'analisi del campione.
4	Invalid	Grigio chiaro*	Errore nel controllo positivo o nel controllo negativo	Ripetere l'intera analisi.

\*Se il risultato è ND, in colore grigio chiaro, significa che sussiste il codice d'errore 3079, vale a dire un'elevata fluorescenza in uno o più canali. Se viene registrato un valore Ct di <39,0 nel canale dell'*Aspergillus*, il risultato s'intende positivo.

- 3.4 Per visualizzare i risultati dei singoli campioni per l'*Aspergillus* o l'IAC separatamente, selezionare **Sample Results** dall'elenco **Views** e cliccare sui rispettivi tab per ogni target. I risultati vengono visualizzati nello stesso formato dei **Patient Results**, ma per ogni singolo target.
- 3.5 Se per un campione del paziente si ottiene il risultato "Invalid", la causa è un errore nel risultato dell'IAC (segnalato dalla voce "Unresolved" nel tab **Sample Results**); in questo caso ripetere la reazione (includendo il

- controllo positivo e negativo). Se la reazione continua a non riuscire, potrebbe essere presente un inibitore nel template, quindi un eventuale risultato "Negative" è inaffidabile.
- 3.6 Per esportare i dati di analisi in modo da trasferirli ad un altro computer, passare alla directory **Tools** in cima alla videata e selezionare **Data Management**, quindi **Archive Run(s)** dal menu a tendina. Appare una videata con un messaggio; cliccare su **Proceed**. Selezionare l'analisi da archiviare spuntando la casella a sinistra, quindi cliccare su **OK**. Appare un messaggio di avvertimento che indica quante analisi possono essere archiviate; se questo numero è corretto, cliccare su **Proceed**. Selezionare una destinazione per il salvataggio del file dell'analisi, ad es. uno stick USB. Cliccare su **Save** e annotare il nome del file. Appare una videata con un messaggio che indica quante analisi possono essere archiviate; se questo numero è corretto, cliccare su **Proceed**.
- 3.7 Per importare i dati dell'analisi, passare alla directory **Tools** in cima alla videata e selezionare **Data Management**, quindi **Retrieve Run(s)** dal menu a tendina. Appare una videata con un messaggio; cliccare su **Proceed**. Passare a **Look In:** e selezionare il dispositivo su cui archiviare i dati dell'analisi (vedere Sezione 3.4 sopra). Selezionare il file dell'analisi da richiamare e cliccare su **Open**. Appare un'altra videata che chiede di selezionare l'analisi che si desidera richiamare. Selezionare l'analisi da richiamare e cliccare su **OK**. Appare una videata con un messaggio che indica quante analisi possono essere richiamate; se questo numero è corretto, cliccare su **Proceed**.
- 3.8 Se è necessaria anche una copia cartacea dei risultati, cliccare su **Report e Print**.

## 4. Guida alla risoluzione dei problemi

### 4.1 Il controllo negativo ha prodotto un segnale positivo nel canale FAM:

- Si è verificata una contaminazione durante la preparazione del test. I risultati dell'intera analisi non possono essere ritenuti affidabili.
- Ripetere l'intera analisi, prestando molta attenzione alla fase di aggiunta dei template, soprattutto il controllo positivo (Provetta 4), per essere certi di escludere una contaminazione crociata.
- Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano accuratamente decontaminati prima e dopo l'uso.
- Il controllo negativo è stato collocato in modo errato nello strumento.
- Verificare che le provette di reazione vengano collocate nei siti previsti.

### 4.2 Il valore Ct IAC del controllo negativo è esterno al range di accettazione:

- Il dosaggio PCR è stato inibito.
- Accertarsi che l'area di lavoro e gli strumenti siano perfettamente asciutti dopo averli trattati con gli agenti decontaminanti prima di preparare il dosaggio PCR.
- Le condizioni di conservazione del kit non hanno rispettato le indicazioni riportate nella sezione "Conservazione" delle presenti istruzioni per l'uso oppure il kit è scaduto.
- Accertarsi che siano state rispettate le condizioni di conservazione corrette del kit. Verificare la data di scadenza dei reagenti (controllando l'etichetta della confezione / della busta) e ripetere l'analisi con un kit non scaduto, se necessario.
- Il reagente della Provetta 1 o 2 non è stato aggiunto alla reazione PCR oppure è stata aggiunta una quantità doppia della Provetta 2.
- Ripetere l'analisi prestando attenzione alla fase di preparazione. Sono presenti tali errori se in una provetta di reazione si osserva un livello superiore o inferiore del liquido rispetto al livello nelle altre.

### 4.3 Il controllo positivo è negativo:

- Le condizioni di conservazione del kit non hanno rispettato le indicazioni riportate nella sezione "Conservazione" delle presenti istruzioni per l'uso oppure il kit è scaduto.
- Accertarsi che siano state rispettate le condizioni di conservazione corrette del kit. Verificare la data di scadenza dei reagenti (controllando l'etichetta della confezione / della busta) e ripetere l'analisi con un kit non scaduto, se necessario.
- Si è verificato un errore durante la fase 1.12 e il template del controllo positivo (Provetta 4) è stato collocato nella provetta di reazione sbagliata.
- Ripetere l'analisi prestando molta attenzione alla fase di preparazione. Sono presenti tali errori se in una reazione si osserva un livello del liquido superiore e in un'altra un livello inferiore rispetto al livello normale.
- Il reagente della Provetta 1 o 2 non è stato aggiunto alla reazione.
- Ripetere l'analisi prestando attenzione alla fase di preparazione. Sono presenti tali errori se in questa reazione si osserva un livello inferiore del liquido rispetto al livello nelle altre.
- Il controllo positivo è stato collocato in modo errato nello strumento.
- Verificare che le provette di reazione vengano collocate nei siti previsti.

### 4.4 Il/i campione/i del/i paziente/i produce/producono l'Esito 3 - "Invalid":

- È probabile che il/i campione/i clinico/i estratto/i contenga/ano inibitori della PCR.
- Per un'estrazione ottimale del DNA seguire la procedura modificata del kit di estrazione manuale del DNA High Pure di Roche, non le istruzioni del produttore.
- Alcune provette per la raccolta di sangue utilizzate per il siero possono contenere inibitori della PCR che non sono stati testati.

#### 4.5 Mancano risultati per uno qualsiasi dei canali con uno qualsiasi dei campioni o dei controlli.

- Le condizioni di conservazione del kit non hanno rispettato le indicazioni riportate nella sezione “Conservazione” delle presenti istruzioni per l’uso oppure il kit è scaduto.
- Accertarsi che siano state rispettate le condizioni di conservazione corrette del kit. Verificare la data di scadenza dei reagenti (controllando l’etichetta della confezione / della busta) e ripetere l’analisi con un kit non scaduto, se necessario.
- L’attrezzatura utilizzata non funziona nel modo ottimale.
- Verificare che lo strumento Real-Time PCR possieda una cronologia di manutenzione aggiornata e sia stato perfettamente tarato come descritto nella relativa Guida di Installazione e Manutenzione.
- È stato utilizzato il file del protocollo errato durante la configurazione del software.
- Consultare la Sezione 2 e selezionare il file del protocollo corretto, come specificato per ogni tipo/versione di software, dal CD-ROM del protocollo Myconostica. È possibile caricare esclusivamente il file corrispondente al software. Ripetere l’analisi con il file del protocollo corretto.

Per qualsiasi domanda o problema non esitate a contattare l’Assistenza Tecnica (mycotech@myconostica.co.uk).

## Caratteristiche di performance e limiti

### Sensibilità analitica

Utilizzando il protocollo sopra descritto e i template PCR generati da Myconostica è stato individuato un limite del bianco (LoB) per il MycAssay™ *Aspergillus* pari a Ct 39,0; il limite di rilevamento (LoD) calcolato a partire da un campione di siero è risultato inferiore a 5 genomi equivalenti. Questa determinazione si basa sul DNA genomico del ceppo AF293 di *Aspergillus fumigatus* aggiunto al siero di soggetti non infetti. È stata identificata la sequenza completa del genoma del ceppo AF293 ed è noto che esistono 37 copie del bersaglio all’interno del genoma, determinate mediante mappatura ottica<sup>8</sup>.

### Specificità analitica

#### La specificità analitica è stata stabilita durante gli studi di convalida per l’uso con campioni respiratori e non è stata ripetuta.

La specificità analitica è stata testata utilizzando il DNA estratto da 15 diverse specie di *Aspergillus*, fra cui numerosi ceppi rispettivamente di *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. nidulans*. I segnali rilevati sopra il LoB sono stati registrati come risultato positivo.

Tutte le 15 specie di *Aspergillus* testate sono risultate positive con il test. Oltre a quelle precedentemente menzionate, esse includono *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, *A. sclerotiorum*, *A. niveus*, *A. lentulus*, *A. unguis*, *A. candidus*, *A. wentii*, *A. tubingensis* e *A. foetidus*.

Anche il DNA genomico estratto da *Penicillium* spp. ha prodotto risultati positivi. Ciò è dovuto al fatto che le sequenze dei bersagli molecolari sono altamente conservate fra *Aspergillus* e *Penicillium*. Per questo motivo, occorre evidenziare che un risultato positivo ottenuto con questo test potrebbe indicare un’infezione da *Penicillium*, piuttosto che da *Aspergillus*.

### Selettività analitica

La selettività analitica è stata testata con il DNA estratto da un’ampia gamma di specie fungine e non fungine. Le seguenti specie sono state testate durante la convalida iniziale per i campioni respiratori e non hanno prodotto un risultato positivo:

*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*. Le seguenti specie batteriche non hanno prodotto un risultato positivo: *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*.

<sup>8</sup> Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature: 438: 1151-6.

Le seguenti specie, la cui presenza è stata specificamente testata nel siero, non hanno prodotto un risultato positivo: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Il DNA genomico umano non produce un risultato positivo con questo test.

### Sostanze interferenti (controindicazioni per l'uso)

Le seguenti sostanze sono state testate in concentrazioni clinicamente rilevanti e hanno dimostrato di non inibire il test: acetilcisteina, amfotericina, beclometasone dipropionato, budesonide, colistimetato sodio, fluticasone propionato, formoterolo fumarato diidrato, ipratropio bromuro, lidocaina, mannitolo, salbutamolo solfato, salmeterolo, sodio cloruro, sodio cromoglicato, terbutalina, tobramicina.

È stata testata la potenziale presenza delle seguenti sostanze nel siero. Sono state testate concentrazioni clinicamente rilevanti, che hanno dimostrato di non inibire la reazione PCR.

Amoxicillina con acido clavulanico, atovaquone, azatioprina, aztreonam, ceftazidime, ciproflaxicina, clorfenamina maleato, clindamicina fosfato, cotrimoxazolo, creatinina, dapsone, desametasone sodio fosfato, fluconazolo, meropenam, metoclopramide cloridrato, paracetamolo, primachina fosfato, prednisone sodio fosfato, prednisone, proclorperazina, vancomicina e voriconazolo.

Le seguenti sostanze hanno dimostrato di inibire le reazioni PCR: cefuroxima, eparina, metilprednisolone sodio succinato, transaminasi e urea. Aggiungendo queste sostanze inibitorie a livelli clinicamente rilevanti al siero contenente DNA di *Aspergillus* estratto con il kit di estrazione del DNA High Pure modificato, non è stata osservata alcuna inibizione. Tuttavia, la transaminasi ha dimostrato di degradare il DNA di *Aspergillus* prima dell'estrazione, in quanto il 25% dei replicati sono risultati negativi per l'*Aspergillus*.

### Report clinico

NOTA: Quando si esamina il report dei risultati accertarsi che sia stato utilizzato il protocollo corretto. Per i campioni sierici deve essere utilizzato il **SERUM MycAssay Asp v1**. L'uso del protocollo errato produce risultati non validi.

Il kit MycAssay™ Aspergillus è concepito come ausilio diagnostico. I risultati devono essere considerati in relazione allo stato clinico del paziente e ai risultati di altri test diagnostici.

I report di seguito consigliati hanno carattere indicativo; ciascuno dipende dall'interpretazione dei risultati del test.

#### Esito n° 1

“*Aspergillus* spp. non rilevato.”

#### Esito n° 2

“*Aspergillus* spp. rilevato. Risultato positivo. Questo test rileva anche il *Penicillium* spp.”

#### Esito n° 3

“Test non riuscito; sono presenti inibitori o altre sostanze sconosciute.”

## Limiti della procedura

- Il limite principale di questa procedura riguarda la qualità del campione primario:
  - Se i livelli di DNA di *Aspergillus* DNA nel sangue sono ridotti, l'efficacia dell'estrazione potrebbe influenzare il risultato e il test potrebbe dare un risultato falso negativo.
  - I dati preliminari indicano che il congelamento e la conservazione dei campioni sierici può influenzare la disponibilità di DNA adeguato per l'analisi.
  - Non sono disponibili dati sulla stabilità del DNA di *Aspergillus* DNA nel sangue intero o nel siero non processato. Si raccomanda, pertanto, di processare i campioni il più rapidamente possibile dopo il prelievo.
  - Non sono disponibili dati sulla performance del siero raccolto in provette per sangue diverse dalle provette per siero Greiner con tappo rosso, cioè quelle raccomandate per il test.
  - Non sono disponibili dati sulle caratteristiche di performance del test eseguito a partire da DNA di *Aspergillus* estratto da plasma o sangue intero.
- Sono possibili risultati falsamente positivi se l'agente infettante è *Penicillium* spp., perché questo non può essere differenziato dall'*Aspergillus* spp. utilizzando il presente kit.
- Sebbene la procedura di estrazione del DNA High Pure possa eliminare gli inibitori della PCR, non sono stati presi in considerazione tutti i farmaci o tutte le popolazioni di pazienti.
- Durante gli studi di convalida analitica è stato osservato che la transaminasi a 22,2 U/0,5mL di siero può causare la degradazione del DNA di *Aspergillus* prima dell'estrazione.
- Durante la convalida sono stati ottenuti e utilizzati lotti di proteinasi K che successivamente hanno dimostrato di essere contaminate (alla fonte) con *Aspergillus*. Vagliare attentamente tutti i materiali e utilizzare fonti raccomandate, se possibile.
- Risultati falsamente positivi possono derivare dalla contaminazione esterna del campione originale o del test. Tale contaminazione potrebbe essere riconducibile ad aria contaminata da *Aspergillus*, tecnica sperimentale di scarsa qualità in relazione al controllo positivo oppure a materiale esterno (in particolare la pipetta) contaminato da DNA di *Aspergillus*.
- Data la possibilità di ottenere un risultato effettivamente positivo per pazienti colonizzati in modo temporaneo o persistente da *Aspergillus* spp., è necessaria una valutazione clinica nell'interpretazione dei risultati del test, vale a dire occorre considerare il contesto della malattia.

## LICENZA

TopTaq™ Hot Start è fornito da QIAGEN. QIAGEN® è un marchio registrato di Qiagen GmbH, Hilden, Germania.

Questo prodotto è venduto con licenza dell'Istituto di Ricerca per la Salute Pubblica di Newark nel New Jersey (USA) e può essere utilizzato nel rispetto dei diritti brevettuali del PHRI esclusivamente per la diagnostica umana *in vitro*.

SmartCycler® è un marchio registrato di Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, USA.

High Pure® è un marchio registrato di Roche Diagnostics, GmbH, 68298 Mannheim, Germania.

Parte del presente prodotto è coperta da una licenza esclusiva relativa ad una domanda di brevetto detenuta dal Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, USA.

IVD



Myconostica Limited, South Court, Sharston Road, Sharston, Manchester, M22 4SN, Regno Unito.  
Telefono: +44 (0) 161 998 7239 Fax: +44 (0) 161 902 2496  
E-mail: mycotech@myconostica.co.uk

