

# MycAssay™ Aspergillus

## Roche LightCycler® 2.0

### Siero

#### 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 invasiva.

MycAssay™ Aspergillus (Siero) è stato convalidato per l'uso con il sistema Roche LightCycler® 2.0.

## 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 unanimesi 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). 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 all'88% (I.C. al 95% 75% - 94%) e al 75% (I.C. al 95% 63% - 84%) e l'odds ratio per i casi dimostrati e probabili è risultato pari a 16,41 (I.C. al 95% 6,43 - 41,88)<sup>4</sup>.

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>5</sup>. L'intera procedura di analisi, compresa l'estrazione del DNA dal campione clinico, può essere completata in circa 2 ore e ½, 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.

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

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

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

<sup>4</sup> Mengoli C. et al The Lancet ID 2009; 9: 86-96

<sup>5</sup> Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology; 14: 303-308.

e una potenziale aumentata sensibilità per l'*Aspergillus* spp. in pazienti fortemente immunocompromessi con presunta aspergillosi 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 dai beacons.

## **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 è previsto esclusivamente per l'uso con il sistema Roche LightCycler® 2.0 e il software LightCycler® v4.1.
- 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.
- 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.
- Accertarsi che tutti i reagenti non inclusi nella fornitura siano privi di contaminazione fungina.
- Per evitare la contaminazione da ampliconi di *Aspergillus* o IAC, non aprire le provette di reazione dopo l'amplificazione.
- Evitare la contaminazione microbica e da deossiribonucleasi (DNAsi) dei reagenti durante il prelievo di aliquote dalle provette.
- Si raccomanda l'impiego di puntali per pipetta 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.
- 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 frigorifero (da 2 a 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> (Cappuccio arancione)	dNTP MgCl <sub>2</sub> Soluzione tamponata di complesso DNA-polimerasi	66 µL
<b>Provetta 2</b> (Cappuccio verde)	Primer < 0,01% 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> (Cappuccio trasparente)	Controllo negativo Acqua	25 µL
<b>Provetta 4</b> (Cappuccio nero)	Controllo positivo 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

- Sistema Real-Time PCR LightCycler® 2.0 di Roche (incluso il manuale d'uso, il computer collegato e il software LightCycler® versione 4.1)
- Centrifuga per carosello LightCycler® 2.0 (in via opzionale adattatori per provette capillari per minicentrifuga)
- Carosello portacampioni per provette capillari da 20 µL
- Provette capillari da 20 µL LightCycler® 2.0 con cappucci
- Portarack per provette capillari
- Dispositivo per il rilascio delle provette capillari
- Penna per l'applicazione dei cappucci
- 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
- Kit di isolamento del DNA (vedere di seguito)
- Kit MycAssay™ CC (vedere di seguito)

## Campioni

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

- High Pure PCR Template Preparation kit (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)

## Kit MycAssay™ CC (Compensazione del Colore)

Un'analisi accurata dei dati ottenuti con il test MycAssay™ Aspergillus richiede l'applicazione di un file di compensazione del colore creato con il kit Myconostica MycAssay™ CC. Una volta creato, il file può essere applicato a più analisi sulla stessa macchina. Per maggiori informazioni contattare il distributore locale.

## 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 dosaggio.
- 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.

<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.

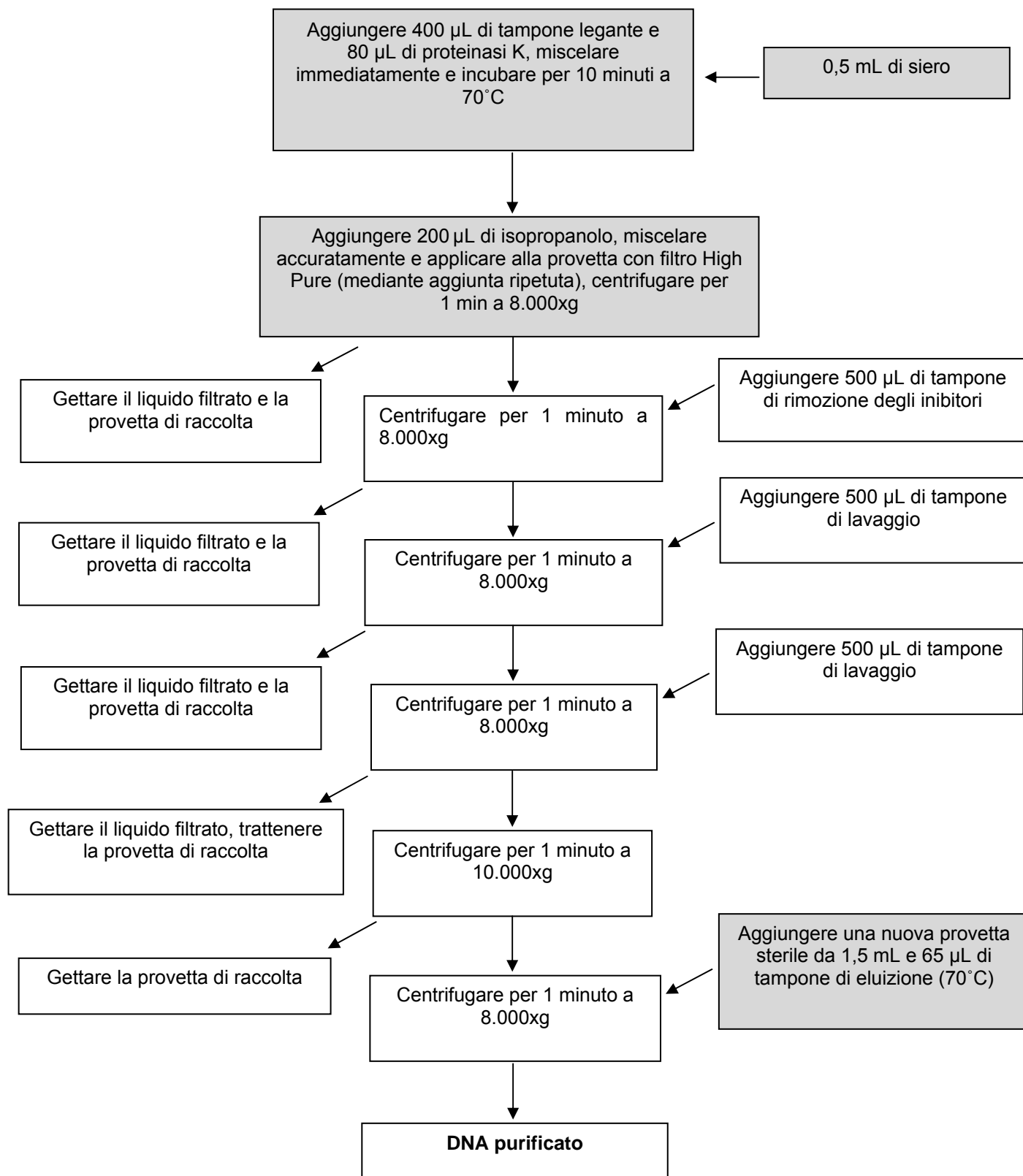
- Annotare esattamente sullo schema di analisi le posizioni di tutte le provette capillari (all'interno del carosello a 32 posizioni) con i corrispondenti ID dei campioni.
- Un'analisi accurata dei dati richiede l'applicazione di un file di compensazione del colore creato con il kit Myconostica MycAssay™ CC.

### **Procedura per l'uso**

La procedura prevede 2 fasi, l'estrazione del DNA dal siero e l'analisi in Real-Time PCR. L'estrazione del DNA avviene mediante l'High Pure PCR Template Preparation Kit (kit High Pure). Il kit High Pure 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 Siero.

**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 del kit High Pure 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 LightCycler® 2.0 (strumento, computer associato e centrifuga) e lanciare il relativo software. Inserire nome utente e password come richiesto e selezionare il database diagnostico. Se si esegue la prima analisi della giornata, effettuare innanzi tutto un autotest dello strumento prima di avviare l'analisi.
- 1.2 **Nota:** occorre aver completato una sessione di compensazione del colore prima di analizzare i risultati del MycAssay™ Aspergillus sul LightCycler® 2.0. Tuttavia, questa procedura non deve essere eseguita necessariamente prima di utilizzare il kit; può essere effettuata e applicata al file di analisi anche a posteriori.
- 1.3 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 la PCR.
- 1.4 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. Tuttavia, il LightCycler® 2.0 può contenere un massimo di 32 campioni in una sola sessione. Ciò significa che in una sola sessione si possono analizzare al massimo 30 campioni (4 buste).
- 1.5 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

- 1.6 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.
- 1.7 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.**
- 1.8 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.
- 1.9 Collocare il numero necessario di provette capillari da 20 µL su un corrispondente portarack. Fare attenzione a non lasciare segni di alcun tipo sul vetro delle provette capillari.
- 1.10 Preparare sempre prima il controllo negativo, seguito dai campioni dei pazienti. Il controllo positivo deve essere preparato sempre per ultimo.

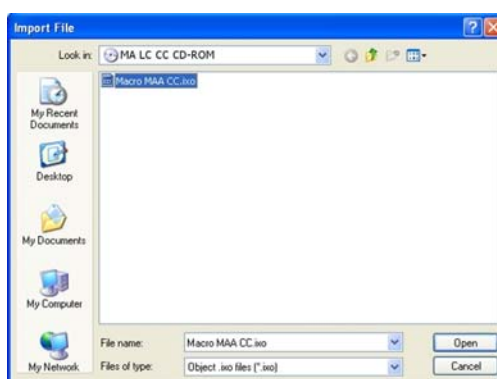
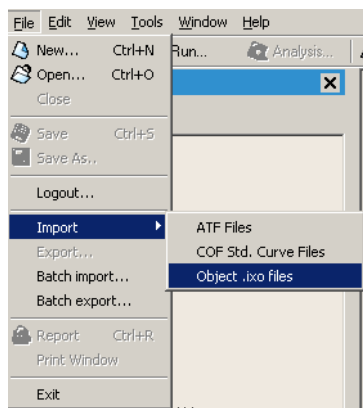
1.11 I volumi dei reagenti e del DNA sono indicati nella tabella sottostante:

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

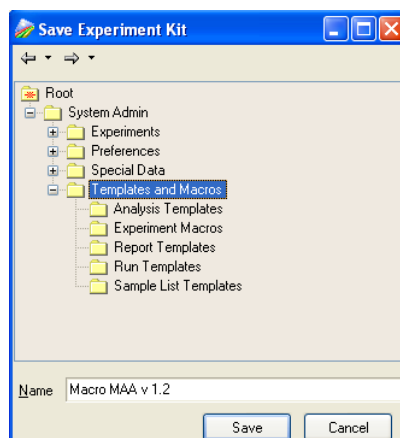
- 1.12 Aggiungere i reagenti nell'ordine indicato in tabella: Provetta 1, quindi Provetta 2, poi il template (controllo negativo, campione del paziente o controllo positivo). Prestare attenzione quando si prelevano le aliquote della Provetta 1; il liquido è viscoso e può aderire al bordo interno della provetta. Se ciò accade, centrifugare di nuovo la provetta per raccogliere il restante contenuto sul fondo prima di cercare di rimuovere le aliquote finali.
- 1.13 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.
- 1.14 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 tutte le altre provette capillari prima di aprire la Provetta 4 si può ridurre il rischio di contaminazione crociata.
- 1.15 Chiudere accuratamente le provette capillari con i rispettivi cappucci inclusi nella scatola delle provette capillari utilizzando l'apposita penna per l'applicazione dei cappucci. Accertarsi che le provette capillari siano saldamente chiuse. Le provette capillari possono essere chiuse dopo aver aggiunto il template alla reazione se si desidera ridurre il potenziale di contaminazione crociata/ambientale.
- 1.16 Se non è disponibile la centrifuga per carosello LightCycler® 2.0, centrifugare i campioni in una minicentrifuga utilizzando gli adattatori per provette capillari in dotazione con il corrispondente portarack. In caso contrario, passare al punto 1.17.
- 1.17 Trasferire con molta attenzione tutte le provette capillari nel carosello portacampioni rispettando esattamente lo stesso ordine in cui sono inserite sul corrispondente portarack; partire dalla prima provetta capillare nella posizione 1 e continuare in ordine crescente senza saltare alcuna provetta. Spingere in giù ogni provetta capillare finché non è saldamente posizionata.
- 1.18 Se non è già stata eseguita la centrifugazione al punto 1.16, centrifugare i campioni utilizzando la centrifuga per carosello LightCycler® 2.0.
- 1.19 Passare immediatamente alla Sezione 2. Le reazioni di MycAssay™ Aspergillus sono stabili sul banco di laboratorio per 60 minuti.
- 1.20 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

- 2.1 Inserire il CD-ROM del protocollo MycAssay™ Aspergillus Myconostica.
- 2.2 Sotto File selezionare Import e poi Object .ixo files. Importare il file MAA SERUM v1.ixc dal CD sul database.



- 2.3 Sotto **File** selezionare **Save** e salvare la macro nella posizione desiderata del database.

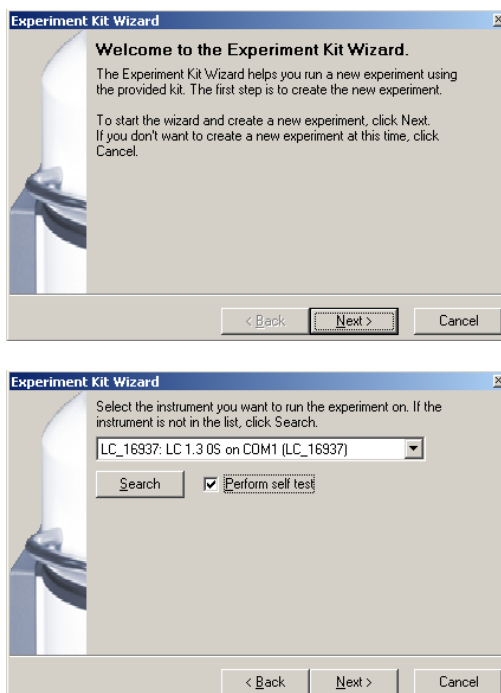


- 2.4 Selezionare l'opzione **Run Macro** dalla toolbar.

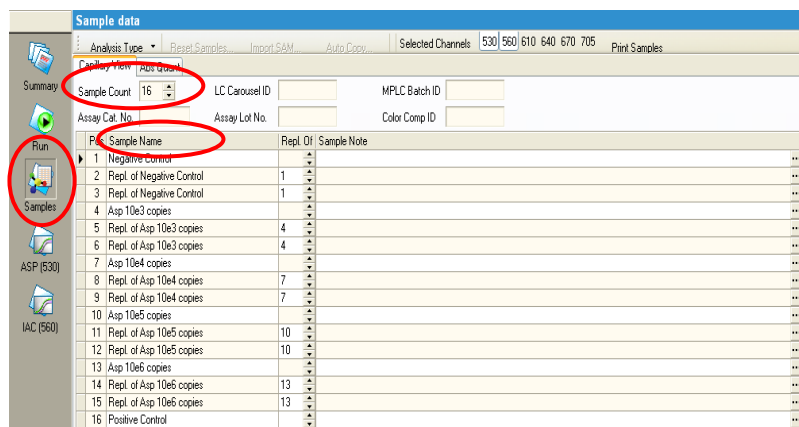


- 2.5 Selezionare il file template **Macro MAA SERUM v1.ixc** e premere **Open**.

- 2.6 Seguire le istruzioni wizard. Spuntare la casella **Perform Self-Test** se si sta eseguendo la prima analisi della giornata.

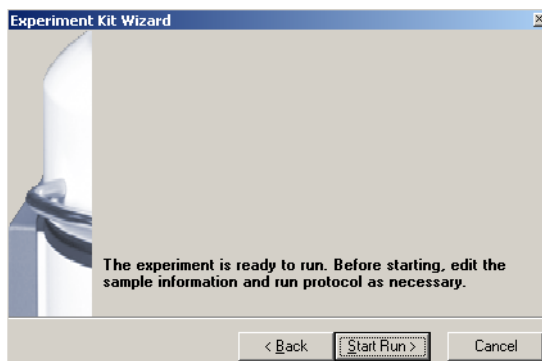


- 2.7 Nominare e salvare il file di analisi nella posizione desiderata.
- 2.8 Passare alla sezione **Samples** cliccando sul corrispondente tab a sinistra della videata. Modificare il numero di campioni nella casella **Samples Count** e i nomi nel tab **Capillary view**. Nominare i campioni come indicato nello schema di analisi in base alla rispettiva posizione sul carosello portacampioni.



- 2.9 Collocare il carosello portacampioni già sottoposto a centrifuga sullo strumento LightCycler® 2.0. Accertarsi che l'incavo sotto la posizione del campione 1 sul carosello combaci esattamente con la posizione del perno sulla camera termica. Controllare che il carosello sia inserito saldamente nella camera, quindi chiudere il coperchio.

- 2.10 Al termine dell'operazione, premere il pulsante **Start Run**. Verificare che lo strumento abbia individuato tutte le provette capillari nel carosello e che il programma si sia avviato.

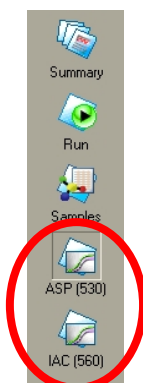


### 3. Analisi e interpretazione dei dati

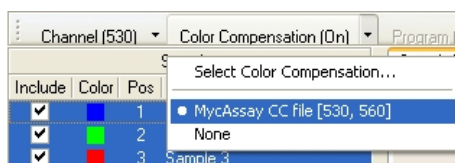
- 3.1 **Nota:** deve essere applicato un oggetto di compensazione del colore prima di analizzare i risultati del MycAssay™ Aspergillus sul LightCycler® 2.0. Se manca l'oggetto di compensazione del colore, crearne uno prima di continuare con l'analisi e l'interpretazione dei dati.

Al termine dell'analisi, controllare il contenuto del report apparso e stamparlo, se necessario.

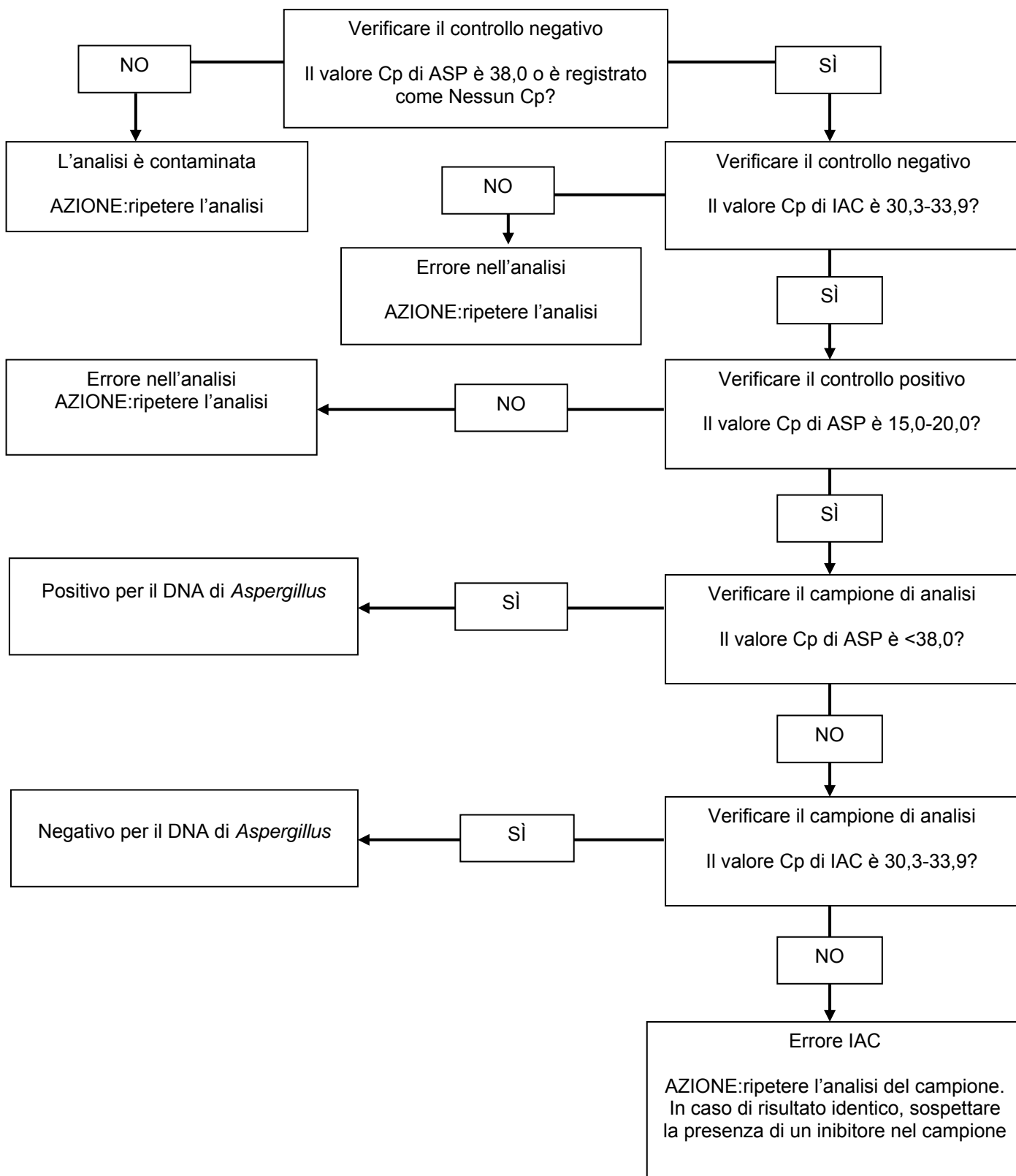
- 3.2 I risultati del MycAssay™ Aspergillus possono essere visualizzati nella sezione di analisi **ASP (530)** ) e i risultati IAC nella sezione di analisi **IAC (560)**.



- 3.3 In entrambe le sezioni, **ASP (530)** e **IAC (560)**, selezionare il corretto file di compensazione del colore (**MycAssay CC file**) da applicare all'analisi.



3.4 Analizzare ogni campione, partendo dai controlli, come mostra il diagramma di flusso seguente (per i dettagli consultare anche la tabella riportata dopo il diagramma):



Campione	Valore Cp del patogeno (530)	Valore Cp di IAC (560)	Interpretazione	Ulteriori azioni
Controllo negativo	38,0 o nessun Cp	Entro 30,3-33,9	Controllo negativo accettabile	I risultati del paziente sono validi.
Controllo negativo	38,0 o nessun Cp	<30,3 o >33,9	Errore nel controllo negativo	Ripetere l'intera analisi.
Controllo negativo	<38,0	Entro 30,3-33,9	Contaminazione	Ripetere l'intera analisi.
Controllo positivo	Entro 15,0-20,0	N/A	Controllo positivo accettabile	I risultati del paziente sono validi.
Controllo positivo	<15,0 o >20,0	N/A	Errore nel controllo positivo	Ripetere l'intera analisi.
Campione del paziente	≥38,0 o nessun Cp	Entro 30,3-33,9	Negativo per l' <i>Aspergillus</i>	Riportare il risultato: Esito 1
Campione del paziente	<38,0	N/A	Positivo per l' <i>Aspergillus</i>	Riportare il risultato: Esito 2
Campione del paziente	≤ 38,0 o nessun Cp	<30,3 o >33,9	Errore IAC nel campione	Ripetere l'analisi del campione: Esito 3

Consultare la sezione "Report clinico" (Esito 1, 2 o 3).

## 4. Guida alla risoluzione dei problemi

### 4.1 Il controllo negativo ha prodotto un segnale positivo nel canale ASP (530):

- 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.
- Accertarsi che le provette capillari siano state designate correttamente nel software.

### 4.2 Il valore Cp 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 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 capillare di reazione si osserva un livello superiore o inferiore del liquido rispetto al livello nelle altre.
- Non è stato applicato ai dati il file CC corretto.
- Creare un file CC utilizzando il kit Myconostica MycAssay™ CC, applicarlo ai risultati e ripetere l'analisi. Per maggiori informazioni sul kit, rivolgersi al distributore locale.

### 4.3 Il controllo positivo è negativo:

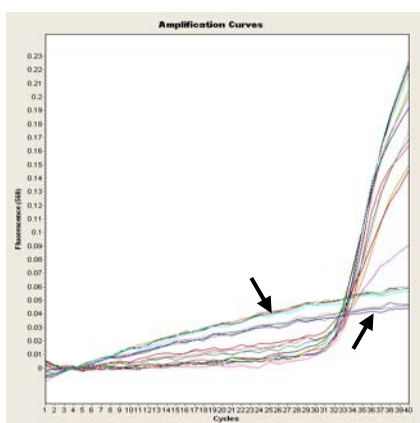
- Le condizioni di conservazione del kit non hanno rispettato le indicazioni riportate nella sezione "Conservazione" delle presenti istruzioni per l'uso oppure il kit è scaduto.

- 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 1.11-1.13 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 provetta capillare di reazione si osserva un livello inferiore del liquido rispetto al livello nelle altre.
- Il controllo positivo è stato collocato in modo errato nello strumento.
- Accertarsi che le provette capillari siano state designate correttamente nel software.

#### 4.4 Il/i campione/i dei pazienti è/sono negativo/i e l'IAC è esterno al range (Esito 3):

- È probabile che il/i campione/i dei pazienti contenga/ano inibitori della PCR.
- Per un'estrazione ottimale del DNA, consigliamo di estrarre il DNA dai campioni con il kit High Pure seguendo la procedura modificata indicata nelle "Procedure per l'uso" e non le istruzioni del produttore.
- Alcune provette di raccolta utilizzate per il siero possono contenere inibitori della PCR che non sono stati testati.

#### 4.5 Il campione del paziente è negativo nella sezione ASP (530) e il grafico dell'IAC (560) devia significativamente rispetto al basale normale (come mostra la figura di seguito riportata; le frecce indicano i grafici normali):



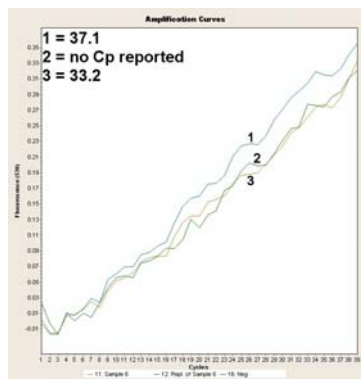
- La reazione PCR è stata inibita.
- Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti siano perfettamente asciutti dopo averli trattati con gli agenti decontaminanti prima di preparare il dosaggio PCR.
- Analizzare di nuovo il campione del paziente. Se il problema persiste, significa che è presente un inibitore della PCR nel campione. Riportare per il campione il risultato "Undetermined" (non rilevato) (Esito 3).

#### 4.6 I risultati nella sezione IAC (560) coincidono quasi esattamente con i risultati nella sezione ASP (530).

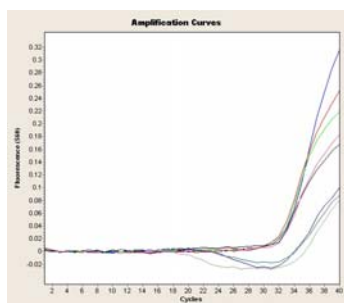
- Non è stato applicato ai risultati di analisi il file di compensazione del colore oppure è stato applicato un file errato.
- Controllare in entrambe le sezioni di analisi se è attiva la compensazione del colore e se è applicato lo stesso file MycAssay™ CC ad entrambi i canali.

#### 4.7 Il basale per alcuni campioni corrisponde al controllo negativo, il che indica che non si è verificata l'amplificazione. Tuttavia, il software ha prodotto un valore Cp positivo (come mostra la figura sottostante):

- Un valore Cp positivo per un grafico di amplificazione negativa è stato ottenuto solo due volte in 154 reazioni negative eseguite durante gli studi di convalida.
- In tale evenienza, ripetere l'analisi del/i campione/i per confermare il risultato *Negative* (negativo).



**4.8 Applicando l'oggetto CC, alcuni valori nel canale IAC 560 si abbassano, producendo valori Cp esterni al range di accettazione:**



- Si tratta di un fenomeno normale per le reazioni contenenti elevate concentrazioni di DNA bersaglio; tale fenomeno non interferisce sull'interpretazione dei risultati dei pazienti.
- Seguire la normale procedura di analisi; si noterà che per i campioni positivi per Aspergillus non è necessario il risultato IAC per prendere una decisione relativamente all'esito per i pazienti interessati.

**4.9 Mancano risultati per uno qualsiasi dei canali con uno qualsiasi dei campioni o dei controlli.**

- Le condizioni di conservazione del kit non sono state conformi alle indicazioni riportate nella sezione "Conservazione" delle presenti istruzioni per l'uso oppure il kit è scaduto.
- Verificare che siano state rispettate le condizioni di conservazione corrette del kit. Controllare la data di scadenza dei reagenti (osservando 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](mailto:mycotech@myconostica.co.uk)).

## Caratteristiche di performance e limiti

Il kit è stato convalidato inizialmente per l'utilizzo con siero assieme al sistema Cepheid SmartCycler®. La sensibilità analitica (limite del bianco) è stata calcolata sulla piattaforma Roche LightCycler® 2.0 utilizzando provette capillari in vetro da 20 µL (Roche cat. # 04929292001 o 11909339001); i relativi dati sono riportati qui di seguito. Le valutazioni non sono state ripetute nei casi in cui si prevedeva che le differenze fra le piattaforme non influenzassero la performance del test e, quindi, gli assunti. In questo caso i risultati ottenuti utilizzando il sistema SmartCycler® sono ritenuti trasferibili alla piattaforma LightCycler® 2.0.

## Sensibilità analitica

Utilizzando il protocollo del sistema LightCycler® 2.0 sopra descritto e i template PCR generati da Myconostica, è stato calcolato per il MycAssay™ un limite del bianco (LoB) di Cp pari a 38,0.

**Utilizzando il sistema Cepheid SmartCycler® sono stati definiti per il siero gli assunti di performance di seguito indicati.**

## 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*, *Rhodotomila 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*.

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.

## Limite di rilevamento

È stato calcolato un valore inferiore a 25 copie del DNA bersaglio. Questa determinazione è stata effettuata con il ceppo AF293 di *A. fumigatus*.

## 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, flucicasona 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, dapsona, 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 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*.

## 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*.

## Report clinico

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. not detected” (*Aspergillus* spp. non rilevato.)

### Esito n° 2

“*Aspergillus* spp. detected; Positive result. This assay also detects *Penicillium* spp.” (*Aspergillus* spp. rilevato. Risultato positivo. Questo dosaggio rileva anche il *Penicillium* spp.)

### Esito n° 3

“Test failed; inhibitors or other unknown substance present” (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 siero 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 siero. 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 dell'High Pure PCR Template Preparation Kit possa eliminare gli inibitori della PCR, non sono stati valutati tutti i farmaci o tutte le popolazioni di pazienti.

- Durante gli studi di convalida analitica è stato osservato che un livello di transaminasi a 22,2 U/0,5 mL 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.

LightCycler® è un marchio registrato di Roche Diagnostics, GmbH.

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

