

# MycXtra®

## Conjunto de extracção de ADN fúngico

REF 080-005

### Utilização prevista

O Conjunto de extracção de ADN fúngico MycXtra® é concebido para o isolamento e a purificação de DNA fúngico presente na lavagem broncoalveolar humana (BAL), no esputo e em outras amostras das vias respiratórias inferiores.

### Resumo e explicação

O conjunto é concebido para isolar ADN de origem fúngica em amostras das vias respiratórias inferiores de doentes suspeitos de infecção fúngica. A extracção do ADN fúngico constitui um primeiro passo fundamental da análise de ADN tipicamente fúngico. Dado ser difícil decompor as paredes das células fúngicas, é necessária uma combinação de processos para otimizar o rendimento; forças mecânicas directas em tampão, seguidas de vários passos de purificação para remover as substâncias inibidoras da PCR (reação em cadeia da polimerase), componentes da parede celular e da matriz humana, seguidos de eluição em tampão. A qualidade do ADN purificado é adequada para análise de PCR em tempo real.

### Princípios do procedimento

Os esporos fúngicos e as hifas presentes na amostra são concentrados por centrifugação e suspendidos de novo num pequeno volume. Em seguida a amostra é transferida para um tubo de *bead beating* contendo esferas, solução lisante, solução com esferas e solução para remoção de inibidores. O princípio consiste em lisar os microrganismos da amostra com uma combinação de detergente e força mecânica contra esferas especializadas. Os componentes celulares são lisados por acção mecânica num vórtice. O ADN libertado das células lisadas é unido a um filtro de spin de sílica. O filtro é lavado e o ADN é recuperado numa solução tamponada e está agora pronto para ulterior análise da PCR.

### Conteúdo

- Suficiente para 10 amostras de doentes

Descrição	Volume (mL)
Tubos de solução de esferas 10 x 2 mL	0,55
Solução S1	0,65
Solução IRS	2,2
Solução S2	2,75
Solução S3	14,5
Solução S4	3,3
Solução S5	1,1

- 10 x unidades de filtros spin em tubos de 2 mL
- 40 x tubos para microcentrifuga (2 mL)
- Instruções de utilização

### Conservação

O conjunto deve ser conservado à temperatura ambiente (15–30 °C) até ao prazo de validade indicado no rótulo da caixa do conjunto, momento em que deve ser eliminado em conformidade com as regulamentações locais.

### Advertências e Precauções

O conjunto destina-se a ser utilizado apenas por profissionais de laboratório. São necessárias práticas e procedimentos de Nível 2 de biossegurança, equipamento e instalações de restrição para manipulações de amostras clínicas não produtoras de aerossóis. Todas as actividades produtoras de aerossóis devem ser conduzidas numa câmara de segurança biológica de Classe II ou III. As amostras clínicas podem incluir microrganismos patogénicos, incluindo, mas não se limitando a, vírus da hepatite ou vírus da imunodeficiência humana. Devem seguir-se as precauções padronizadas e as directrizes institucionais na manipulação de todos os artigos contaminados com sangue e outros fluidos corporais. O conjunto contém pequenas quantidades de: etanol, dodecilsulfato de sódio, hidróclorato de

guanidina e isotiocianato de guanidina. A Myconostica Ltd. disponibiliza uma Ficha de dados de segurança do material (MSDS).

## Equipamento necessário

- Microcentrífuga (10,000 x g)
- Centrífuga para fins gerais
- Micropipetas com pontas de filtro estéreis (volumes necessários 40 µL–1000 µL),
- Agitador de vórtice Genie 2 (Scientific Industries mas disponível nos fornecedores locais)
- Placa de adaptação (disponibilizada pela Myconostica REF 080-015) para ligar os tubos ao agitador de vórtice.

## Observações metodológicas

O processo demora 1,5 horas, aproximadamente. Se a amostra for esputo ou se a amostra de BAL parecer viscosa, é necessário um pré-tratamento adicional, conforme descrito no 'Procedimento para esputo ou outras amostras respiratórias viscosas' na secção seguinte.

**Antes de começar, leia todo o protocolo. Use sempre luvas. Todos os tubos devem estar tapados nos diferentes passos de agitação no vórtice. Utilize micropipetas para transferência de fluidos. Tenha o cuidado de identificar devidamente os tubos quando processar amostras de vários doentes.**

### Procedimento para amostras de BAL, transparentes de fluência livre:

**Nota:** Se o ADN extraído for subseqüentemente utilizado com um produto Myconostica MycAssay™ recomenda-se que comece com ≥ 2 mL de BAL.

1. Centrifugue a amostra de BAL durante 20 min a 3000 x g. Decante o sobrenadante e conserve.
2. Devolva 800 µL do sobrenadante conservado ao sedimento, volte a suspender e transfira para o tubo da microcentrífuga (fornecido).
3. Centrifugue durante 2 min a 10.000 x g, em seguida remova o sobrenadante. Volte a suspender o sedimento na solução restante no tubo e transfira toda a quantidade para um tubo de solução de esferas de 2 mL.
4. Inverta suavemente para misturar.
5. **Verifique a solução S1.** Se a solução S1 tiver precipitado, aqueça o tubo na mão e agite no vórtice para dissolver.
6. Adicione 60 µL de solução S1 ao tubo da solução de esferas e inverta várias vezes ou agite por instantes no vórtice.
7. Adicione 200 µL de solução IRS (Solução para Remoção de Inibidores) ao tubo da solução de esferas.
8. Fixe o(s) tubo(s) de solução de esferas na horizontal numa placa de adaptação ao vórtice adequada (disponibilizada pela Myconostica REF 080-015). Agite no vórtice à velocidade máxima durante 10 min.
9. Centrifugue o(s) tubo(s) de solução de esferas a 10.000 x g durante 30 s. **ATENÇÃO:** Certifique-se de que não ultrapassa 10.000 x g ou pode partir os tubos. Certifique-se de que os tubos de 2 mL rodam livremente na centrífuga sem esfregarem.
10. Transfira 450 µL de sobrenadante para um tubo de microcentrífuga limpo (fornecido) tendo o cuidado de não perturbar as esferas. Elimine o tubo de solução de esferas.
11. Adicione 250 µL de solução S2 ao sobrenadante e agite no vórtice durante 5 s. Incube a 4–8 °C durante 5 min.
12. Centrifugue os tubos durante 1 min a 10.000 x g.
13. Evitando o sedimento, transfira todo o volume do sobrenadante para um tubo de microcentrífuga limpo (fornecido).
14. Adicione 1,1 mL (2 x 550 µL) de solução S3 ao sobrenadante (é necessário cuidado pois o tubo está quase cheio). Misture mediante inversão.
15. Carregue aproximadamente 650 µL num filtro *spin* e centrifugue a 10.000 x g durante 30 s. Elimine o escoamento, adicione mais 650 µL de sobrenadante ao filtro *spin* e centrifugue a 10.000 x g durante 30 s. Repita até todo o sobrenadante ter passado pelo filtro *spin*. **Nota:** No total são necessários três carregamentos por cada amostra processada. No *spin* final, centrifugue a 10.000 x g durante 1 min. Elimine o escoamento.
16. Adicione 300 µL de solução S4 ao filtro *spin* e centrifugue durante 30 s a 10.000 x g.
17. Elimine o escoamento.
18. Centrifugue de novo durante 1 min para remover os últimos vestígios de S4 que inibem a reacção PCR.
19. Coloque cuidadosamente o filtro *spin* num tubo para microcentrífuga limpo e novo (fornecido). Evite a contaminação da solução S4 para o filtro *spin*.
20. Adicione cuidadosamente 40 µL de solução S5 ao centro da membrana do filtro *spin* branco. Deixe à temperatura ambiente durante 2 min.
21. Centrifugue durante 30 s a 10.000 x g.
22. Elimine o filtro *spin*. O ADN do tubo está agora pronto a utilizar numa aplicação PCR. Conserve a 2–8 °C até ao máximo de 5 dias, de outro modo conserve o ADN congelado a -20 °C.
23. Podem ser processadas até 10 amostras de BAL. Se não forem utilizados todos os componentes de uma vez, devolva os componentes do conjunto à caixa original. Não misture lotes diferentes.
24. Uma vez concluído o processamento, os componentes do conjunto utilizados devem ser eliminados em conformidade com as regulamentações locais relativas a saúde, segurança e ambiente.

## Procedimento para esputo e outras amostras respiratórias viscosas

Recomenda-se a utilização do conjunto de digestão/descontaminação de amostras BD BBL™ MycoPrep™ para o processamento de amostras micobacterianas (Ref. 240862) com o protocolo MycXtra® para preparação de amostras de esputo. O procedimento abaixo foi modificado para se adequar aos requisitos de introdução de amostras do conjunto MycXtra®.

### Precauções

O reagente NALC-NaOH presente no conjunto de digestão/descontaminação de amostras BD BBL™ MycoPrep™ para o processamento de amostras micobacterianas contém bases fortes e pode provocar queimaduras graves. Retire imediatamente toda a roupa contaminada. Deve usar luvas e protecção ocular/facial. NaOH é irritante para os olhos e pele. No caso de contacto com os olhos ou a pele, lave imediatamente com um sistema de lavagem ocular ou com água da torneira durante, no mínimo, 15 min e consulte um médico. Em caso de ingestão, tome leite, clara de ovo ou água em abundância e consulte um médico.

**Atenção:** Quebre a ampola junto ao centro de uma vez. Não manipule mais a ampola, pois o frasco de plástico pode perfurar e ocorrer lesão.

**Instruções de conservação:** Após a recepção, conserve a 15–30 °C. Não congelar. Não abra até estar pronto para utilizar.

**Deterioração do produto:** Não utilize reagentes se as ampolas estiverem quebradas ou se apresentarem evidências visíveis de deterioração. Não utilize tampão fosfato se as embalagens estiverem rasgadas ou abertas.

### Procedimento

1. Prepare a solução de tampão fosfato BBL™ MycoPrep™. Verta o conteúdo de uma saqueta de tampão fosfato num recipiente de vidro com tampa roscada e encha até à linha de 500 mL com água de qualidade para biologia molecular. Esterilize em autoclave com a tampa solta a 121 °C durante 15 min. Deixe arrefecer até à temperatura ambiente e aperte a tampa.
2. Desaperte cuidadosamente a tampa roscada do frasco de reagente BBL™ MycoPrep™. Localize a ampola no frasco, esprema o ar excessivo do frasco e aperte a tampa. Com o frasco na posição vertical, esprema-o até quebrar a ampola. Agite suavemente para dissolver o NALC. Evite a agitação excessiva. **UMA VEZ A AMPOLA QUEBRADA, UTILIZE O REAGENTE NO PRAZO DE 24 horas.**
3. Numa câmara de segurança biológica (no mínimo de Classe 2), utilizando um tubo de centrifuga graduado de 50 mL com tampa roscada, adicione a amostra e duas vezes o montante de solução activada de NALC-NaOH estimando o volume do esputo. Por exemplo: adicione 4 mL de solução activada de NALC-NaOH até aproximadamente 2 mL de amostra.
4. Tape o tubo de centrifuga e agite num agitador de vórtice até solubilizar a amostra. No caso de uma amostra particularmente viscosa, adicione mais solução de NALC-NaOH e repita a agitação.
5. Deixe a mistura repousar à temperatura ambiente durante 15 min com suave agitação ocasional.
6. Adicione o tampão fosfato preparado até à marca de 35 mL do tubo de centrifuga e agite. Centrifugue durante 20 min a 3000 x g.
7. Decante cuidadosamente todo o fluido sobrenadante. Utilizando uma micropipeta, remova cuidadosamente todo o sobrenadante restante que não tenha sido decantado.
8. Adicione 800 µL de tampão fosfato preparado e volte a suspender o sedimento. Transfira tudo para um tubo de microcentrifuga.
9. Siga o procedimento BAL a partir do passo 3.

## Características e limitações do desempenho

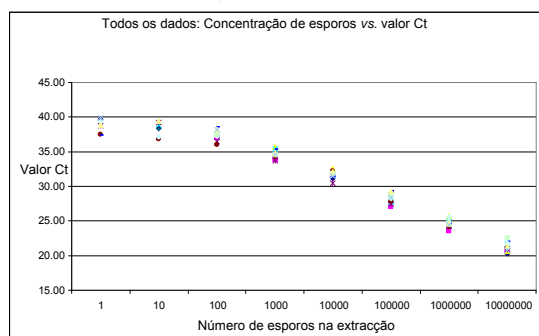
### Selectividade analítica

Utilizando um conjunto MycXtra® foi extraído ADN de BAL clínica, esputo e outras amostras respiratórias em que foram identificados, por cultura ou microscopia, os seguintes organismos: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.* e *Pneumocystis jirovecii*. Foi detectado ADN utilizando o conjunto Myconostica FXG™ : conjunto RESP (Asp +) para a detecção rápida em PCR em tempo real de ADN de *Aspergillus* e *Pneumocystis* em amostras respiratórias clínicas.

### Remoção de substâncias interferentes

Fármacos comuns utilizados no tratamento de doenças respiratórias, por exemplo, tobramicina, sulfato de colistina, dornase (DNase), salmeterol e outros materiais, por exemplo, soro fisiológico normal (0,9%), heparina e ácido tânico, podem inibir a análise de PCR em tempo real. São completamente removidos pelo processo de extracção MycXtra®. Os ensaios de avaliação do desempenho utilizando amostras clínicas indicaram que existem alguns inibidores da PCR nas amostras respiratórias, de natureza pouco clara, que não são removidos durante o processo de extracção.

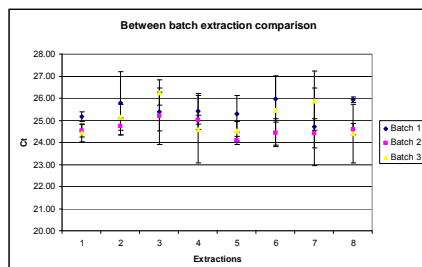
### Limites de detecção e repetibilidade



O conjunto MycXtra® extraiu ADN de amostras contendo apenas 10 esporos. Foram realizadas extracções de esporos de *Aspergillus fumigatus* em soro fisiológico por 2 operadores no decurso de 5 dias. Foi detectado ADN com o conjunto Myconostica FXG™ : conjunto RESP (Asp +), que tem um limite de detecção de aproximadamente 1 genoma *A. fumigatus*. Os resultados são indicados na Figura 1. O coeficiente de variação geral foi calculado em 2,4%. A eficiência de extracção média foi determinada como sendo de 8%.

Figura 1. Concentração de esporos de *Aspergillus fumigatus* versus valor Ct na PCR em tempo real

### Reprodutibilidade



Foram realizadas 24 extracções separadas utilizando cada de três lotes de conjuntos MycXtra® utilizando uma suspensão padronizada de esporos de *Aspergillus fumigatus*. Foi então realizada a PCR em tempo real utilizando o conjunto Myconostica FXG™ : conjunto RESP (Asp +), para determinar a variabilidade inter e intralote da extracção de ADN de *Aspergillus fumigatus*. Os resultados são indicados na Figura 2.

Figura 2. Variação da extracção inter e intralote

### Avaliação do desempenho

#### Detecção da espécie *Aspergillus*

Amostras respiratórias (BAL) colhidas em 2 hospitais, extraídas com o conjunto MycXtra® e conservadas foram utilizadas para avaliar o desempenho do conjunto MycAssay™ *Aspergillus* em amostras clínicas. Foram feitas comparações com o diagnóstico clínico.

O valor de *cut-off* com um Ct de 36,0 foi estabelecido a seguir à análise de um conjunto de dados de amostras provenientes de centros diferentes e de populações de doentes diferentes. Os *cut-offs* diferentes foram avaliados relativamente à probabilidade de diferenciamento entre estado patológico e estado não patológico.

#### PCR vs Diagnóstico clínico

	Positivo clínico	Negativo clínico		
PCR positiva	31	1	0,97	PPV
PCR negativa	2	10	0,83	NPV
	0,94	0,91		
	Sensibilidade	Especificidade		

Das amostras testadas, 0,8% continham inibidores da PCR, conforme indicado pelo IAC, a seguir à extracção com o conjunto MycXtra®.

**Detecção de *Pneumocystis jirovecii***

Amostras clínicas colhidas por lavagem broncoalveolar (BAL) obtidas em 2 hospitais, extraídas com o conjunto MycXtra® e conservadas foram utilizadas para avaliar o desempenho do conjunto MycAssay™ *Pneumocystis*. Foram feitas comparações entre os resultados da PCR e a microscopia de imunofluorescência.

**PCR vs Diagnóstico de microscopia**

	Microscopia positiva	Microscopia negativa		
PCR positiva	45	8	0,85	PPV
PCR negativa	2	33	0,94	NPV
	0,96	0,80		
	Sensibilidade	Especificidade		

A tabela 1 representa dados obtidos de doentes com HIV diagnosticada, doentes não infectados com HIV e doentes com estado de HIV indeterminado. Doentes com pneumonia por *Pneumocystis* possuem quantidades altamente variáveis de organismos detectáveis; quando menor o valor Ct maior a possibilidade de doença. Doentes com HIV e pneumonia por *Pneumocystis* tendem a ter números mais elevados de organismos detectáveis do que doentes que não estejam infectados com o vírus, mas a sobreposição é considerável. O gráfico de dispersão na Figura 3 abaixo demonstra esta sobreposição. Para conclusão, como o conjunto de dados da Tabela incluía doentes cujo estado de HIV era desconhecido, o gráfico de dispersão deste grupo está incluído na Figura 3 (coluna 3):

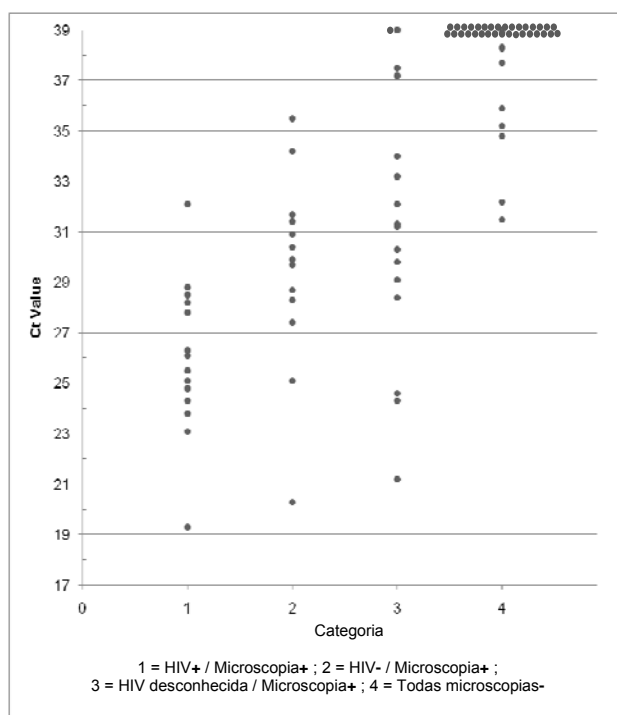


Figura 3: Gráfico de dispersão dos valores Ct obtidos a partir do DNA extraído de amostras respiratórias de doentes. São descritos quatro grupos.

