

MycXtra®

Fungal DNA ekstraktionssæt

REF 080-005

Tilsigtet anvendelse

MycXtra® Fungal DNA ekstraktionssættet er beregnet til isolering og rensning af fungal DNA tilstedeværende i human bronkoalveolær lavage (BAL), opspyt og andre prøver fra de nedre luftveje.

Resumé og forklaring

Sættet er beregnet til at isolere DNA af fungal oprindelse i prøver fra de nedre luftveje fra patienter med mistænkt svampeinfektion. Fungal DNA-ekstraktion er et kritisk første trin ved analysering af prøver for svampespecifik DNA. Da svampecellers vægge er vanskelige at nedbryde, kræves der en kombination af processer for at optimere udbyttet; direkte mekaniske kræfter i bufferen fulgt af flere rensningstrin for at fjerne PCR-hæmmende substanser, cellevægge og humane matrix-komponenter, efterfulgt af eluering i bufferen. Kvaliteten af rensed DNA er egnet til reeltids PCR-analyse.

Procedurens principper

Svampeporer og hyfer, der er til stede i en prøve, koncentrerer ved centrifugering og suspenderes igen i et lille volumen. Derefter tilsættes prøven til et bead beating-rør, der indeholder kugler, lysisopløsning, kugle-opløsning og inhibitor-fjerneropløsning. Princippet er at lysere mikroorganismene i prøven ved en kombination af rensmiddel og mekanisk kraft imod specialiserede kugler. Celledelene lyses ved mekanisk påvirkning på en Vortex-mixer. Fra de lysede celler bindes det udvundne DNA til et silica-centrifugeringsfilter. Filteret vaskes og DNA'en genindvindes i en bufferet opløsning og er nu egnet til efterfølgende PCR-analyse.

Sættets indhold

- Tilstrækkelig til 10 patientprøver

<u>Beskrivelse</u>	<u>Volumen (ml)</u>
10 x 2 ml Bead Solution-rør	0,55
Solution S1	0,65
IRS solution	2,2
Solution S2	2,75
Solution S3	14,5
Solution S4	3,3
Solution S5	1,1

- 10 x centrifugeringsfilterenheder i 2 ml rør
- 40 x mikrocentrifugerør (2 ml)
- Brugsanvisning

Opbevaring

Sættet skal opbevares ved stuetemperatur (15 til 30 °C) indtil udløbsdatoen, der er angivet på etiketten på sættets boks. Derefter skal det kasseres og bortskaffes ifølge lokale forskrifter.

Advarsler og forholdsregler

Sættet er udelukkende beregnet til at blive anvendt af professionelle laboratoriemedarbejdere. Der kræves biosikkerhed niveau 2-praxis og -procedurer, indeslutningsudstyr og -faciliteter til ikke-aerosolproducerende manipulationer af kliniske prøver. Alle aerosol-genererende aktiviteter skal udføres i et Klasse II eller III biologisk sikkert kabinet. Patogene mikroorganismer inklusive, men ikke begrænset til, hepatitis vira og human immundefekt virus, kan være til stede i kliniske prøver. Standardforholdsregler og institutionsretningslinjer skal følges ved enhver håndtering af alle emner, der er kontamineret blod og andre kropsvæsker. Sættet indeholder små mængder af: etanol, sodium dodecyl sulphate, guanidine hydrochloride og guanidine isothiocyanate. Et materialesikkerhedsdatablad (MSDS) kan fås hos Myconostica Ltd.

Nødvendigt udstyr

- Mikrocentrifuge (10.000 x g)
- Centrifuge til generel anvendelse
- Mikro-pipetter med sterile filter-tips (nødvendigt volumen 40 µl–1000 µl),
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, men kan erhverves hos lokale leverandører)
- Vortex adaptor plate (kan erhverves hos Myconostica REF 080-015) til at fastgøre rør til vortex.

Bemærkninger til proceduren

Processen tager ca. 1,5 timer. Hvis prøven er opspyt eller BAL-prøven forekommer viskøs, kræves der yderligere forbehandling som beskrevet i afsnittet "Procedure for opspyt eller andre viskøse respirationsprøver" nedenfor.

Læs hele protokollen inden arbejdet påbegyndes. Bær altid handsker. Alle rør skal være forsynet med hætte, når der udføres vortex-mixing. Brug mikropipetter til overføring af væsker. Vær forsigtig med at identificere rørene korrekt, når der behandles flere patientprøver ad gangen.

Procedure for klare, frit-flydende, BAL-prøver

Bemærk: Hvis den ekstraherede DNA efterfølgende skal bruges med et Myconostica MycAssay™ produkt, anbefaler vi at starte med ≥ 2 ml BAL

1. Centrifuger BAL-prøven i 20 minutter ved 3000 x g. Hæld supernatanten fra og bevar den.
2. Returnér 800 µl af den bevarede supernatant til pillen, suspender igen og overfør til et mikrocentrifugerør (medleveres).
3. Centrifuger i 2 minutter ved 10.000 x g og fjern derefter al supernatant. Suspender pillen igen i den opløsning, der er tilbage i røret og overfør hele mængden til et 2 ml Bead Solution-rør.
4. Vend forsigtigt røret om for at blande.
5. **Kontrollér Solution S1.** Hvis Solution S1 er bundfældet, skal røret opvarmes i hånden og vortex-mixes for at opløse den.
6. Tilsæt 60 µl af Solution S1 til Bead Solution-røret og vend de tom adskillige gange eller vortex-mix kort..
7. Tilsæt 200 µl af Solution IRS (Inhibitor Removal Solution = inhibitor-fjerneropløsning) til Bead Solution-røret.
8. Fastgør Bead Solution-rør vandret på en vortex adapterplade (kan erhverves hos Myconostica REF 080-015). Vortex-mix ved maks. hastighed i 10 min.
9. Centrifuger Bead Solution-røret(rørene) ved 10.000 x g i 30 sek. **FORSIGTIG:** Sørg for ikke at overskride 10.000 x g, ellers kan rørene gå i stykker. Kontrollér at 2 ml-rørene roterer frit i centrifugen uden at gnide imod hinanden.
10. Overfør 450 µl supernatant til et rent mikrocentrifugerør (medleveret), idet der sørges for ikke at forstyrre kuglerne. Kassér Bead Solution-røret.
11. Tilsæt 250 µl af Solution S2 til supernatanten og vortex-mix i 5 sek. Inkubér ved 4–8 °C i 5 min.
12. Centrifuger rørene i 1 minut ved 10.000 x g.
13. Undgå pillen og overfør hele voluminet til supernatanten til et rent mikrocentrifugerør (medleveret).
14. Tilsæt 1,1 ml (2 x 550 µl) af Solution S3 til supernatanten (gøres med forsigtighed, da røret næsten er fuldt). Bland ved at vende røret om.
15. Hæld ca. 650 µl på et centrifugeringsfilter og centrifuge ved 10.000 x g i 30 sek. Kassér den gennemstrømmede væske, tilsæt på ny 650 µl supernatant til centrifugeringsfilteret og centrifuger ved 10.000 x g i 30 sek. Gentag, indtil al supernatant har passeret igennem centrifugeringsfilteret. **Bemærk:** Der kræves i alt tre påhældninger for hver prøve. Ved den endelige centrifugering centrifugeres ved 10.000 x g i 1 min. Kassér den gennemstrømmede væske.
16. Tilsæt 300 µl af Solution S4 til centrifugeringsfilteret og centrifuger i 30 sek. ved 10.000 x g.
17. Kassér den gennemstrømmede væske.
18. Centrifuger igen i 1 minut og fjern de sidste rester af S4, som vil hæmme PCR-reaktionen.
19. Anbring forsigtigt centrifugeringsfilteret i et nyt, rent mikrocentrifugerør (medleveret). Undgå enhver medoverførsel af S4 til centrifugeringsfilteret.
20. Tilsæt forsigtigt 40 µl af Solution S5 til midten af den hvide centrifugeringsfilter membran. Lad det stå i stuetemperatur i 2 min.
21. Centrifuger i 30 sek. ved 10.000 x g.
22. Kassér centrifugeringsfilteret. DNA'en i røret er nu klar til anvendelse i et PCR-program. Kan opbevares ved 2–8 °C i op til 5 dage, ellers skal DNA'en opbevares i frossen tilstand ved -20 °C.
23. Der kan behandles op til 10 BAL-prøver. Hvis ikke alle dele anvendes ved ét tilfælde, lægges sættets dele tilbage i den originale boks. Forskellige partier må ikke blandes.
24. Når behandlingen er gennemført, skal brugte sæt-dele bortskaffes i henhold til lokale sundheds-, sikkerheds-, og miljøbestemmelser.

Procedure for opspyt eller andre viskøse respirationsprøver

Det anbefales at anvende BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/ Decontamination Kit for Processing of Mycobacterial Specimens (Kat.nr. 240862) sammen med MycXtra® protokollen til forberedelse af opspyt-prøver. Nedenstående procedure er modificeret og tilpasset til MycXtra®-sættets prøve-inputkrav.

Forholdsregler

NALC-NaOH-reagensen i BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/ Decontamination Kit for Processing of Mycobacterial Specimens indeholder stærke alkaliske stoffer og kan forårsage alvorlige forbrændinger. Tag straks alt forurenet tøj af. Der skal bruges handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse. NaOH irriterer øjne og hud. I tilfælde af kontakt med øjne eller hud skal der omgående skylles med et øjenskyllsystem eller postevand i mindst 15 minutter og søges lægehjælp. Ved indtagelse skal der indgives mælk, æggehvide eller store mængder vand og søges lægehjælp.

Forsigtig: Bryd kun ampullen én gang tæt på midten. Manipuler ikke ampullen yderligere, da plastikflasken kan gå i stykker og der kan opstå kvæstelse.

Opbevaringsanvisninger: Opbevar efter modtagelse ved 15–30 °C. Må ikke fryses. Må ikke åbnes, før man er klar til at bruge det.

Produktforringelse: Brug ikke reagenser, hvis ampuller er brudt/gået i stykker eller der er synlige tegn på forringelse. Brug ikke fosfatbufferen, hvis emballagen er revet i stykker eller uforseglet.

Fremgangsmåde

1. Forbered BBL™ MycoPrep™ fosfatbufferopløsningen. Hæld indholdet af én fosfatbuffer-portionspakning i en glasbeholder med skruelåg og fyld op til 500 ml-linjen med "molecular biology grade"-vand. Sterilisér med låget løsnet i en autoklave ved 121 °C i 15 minutter. Køl ned til stuetemperatur og skru låget fast.
2. Løsn forsigtigt skruelåget på BBL™ MycoPrep™ reagensflasken. Anbring ampullen i flasken, pres overskydende luft ud af flasken og skru låget fast. Hold flasken i opretstående position og tryk flasken sammen, indtil ampullen går i stykker. Ryst forsigtigt for at opløse den indeholdte NALC. Undgå at ryste overdrevent. NÅR AMPULLEN ER GÅET I STYKKER, SKAL REAGENSEN BRUGES INDEN FOR 24 TIMER.
3. Brug et gradueret 50 ml centrifugerør med skruelåg og tilsæt, i et biologisk sikkert kabinet (minimum Klasse 2), prøven og den dobbelte mængde af aktiveret NALC-NaOH-opløsning ved at estimere opspyttets volumen. For eksempel: Tilsæt 4 ml aktiveret NALC-NaOH-opløsning til ca. 2 ml af prøven.
4. Sæt låget på centrifugerøret og mix på en Vortex-type mixer, indtil prøven er gjort opløselig. Hvis prøven er særlig viskøs, tilsættes mere NALC-NaOH-opløsning og der mixes igen.
5. Lad blandingen stå ved stuetemperatur i 15 minutter, mens den rystes forsigtigt af og til.
6. Tilsæt den forberedte fosfatbuffer til 35 ml-mærket på centrifugerøret og mix det. Centrifuger i 20 minutter ved 3.000 x g.
7. Hæld forsigtigt al supernatant væske fra. Brug en mikropipette og fjern forsigtigt al resterende supernatant, som ikke er hældt fra.
8. Tilsæt 800 µL af den forberedte fosfatbuffer og suspender sedimentet igen. Overfør hele mængden til et mikrocentrifugerør.
9. Følg BAL-proceduren fra trin 3.

Præstationskarakteristika og -begrænsninger

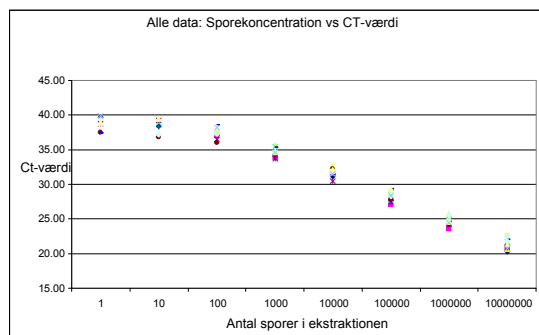
Analytisk selektivitet

Ved hjælp af et MycXtra®-sæt blev DNA ekstraheret fra klinisk BAL, opspyt og andre respirationsprøver, fra hvilke de følgende organismer var blevet identificeret ved hjælp af podning eller mikroskopi. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.* og *Pneumocystis jirovecii*. DNA blev påvist ved hjælp af Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) sæt til for hurtig realtids PCR-påvisning af *Aspergillus* and *Pneumocystis* DNA i kliniske respirationsprøver.

Fjernelse af påvirkende substanser

Almindelige lægemidler, der bruges til behandling af luftvejssygdom, f.eks. Tobramicin, colistin sulphate, Dornase (DNase), Salmeterol og andre materialer, f.eks. normalt saltvand (0.9%), heparin og garvesyre kan hæmme realtids PCR-analyser. Disse fjernes fuldstændigt ved MycXtra® ekstraktionsprocessen. Præstationsevalueringens undersøgelser med kliniske prøver indikerede, at der eksisterer nogle PCR-inhibitorer i respirationsprøver, hvilke typer er uklart, som ikke fjernes under ekstraktionsprocessen.

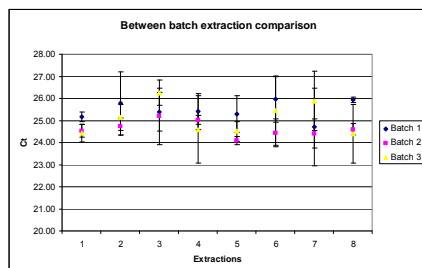
Begrænsninger i påvisning og repeterbarhed



MycXtra® sættet ekstraherede DNA fra prøver, der indeholdt så få som 10 sporer. Ekstraktioner af *Aspergillus fumigatus* sporer i saltvand blev udført af 2 operatører i løbet af 5 dage. DNA blev påvist ved hjælp af Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) sæt som har en påvisningsgrænse på ca. 1 *A. fumigatus* genom. Resultaterne er vist i Figur 1. Den generelle variationskoefficient blev beregnet ved 2,4%. Ekstraktionsmiddelvirkningsgraden blev bestemt til at være 8%.

Figur 1. *Aspergillus fumigatus* sporekoncentration versus realtids PCR-Ct-værdi

Reproducerbarhed



Der blev udført fire separate ekstraktioner ved hjælp af hver af de tre batch'er MycXtra®-sæt ved hjælp af en standard *Aspergillus fumigatus* sporesuspension. Derefter blev der gennemført en realtids PCR, ved hjælp af Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) sættet, for at bestemme variabiliteten imellem og inden de enkelte batch for *Aspergillus fumigatus* DNA ekstraktion. Resultaterne er vist i Figur 2.

Figur 2. Ekstraktionsvariation mellem og inden for de enkelte batch

Præstationsevaluering

Påvisning af *Aspergillus*-arter

Respirationsprøver (BAL), der var blevet indsamlet fra 2 hospitaler, ekstraheret ved hjælp af MycXtra® sættet og opbevaret, blev brugt til at evaluere præstationen af MycAssay™ *Aspergillus* sættet med kliniske prøver. Der blev foretaget sammenligninger af klinisk diagnose.

Cut-off-værdien med en Ct-værdi på 36,0 blev fastslået efter en gennemgang af et datasæt fra prøver, der var indhentet fra forskellige steder og forskellige patientpopulationer. Forskellige cut-off-værdier blev evalueret for sandsynligheden for differentiering mellem sygdomstilstand og ikke-sygdomstilstand.

PCR v klinisk diagnose

	Klinisk positiv	Klinisk negativ
PCR positiv	31	1
PCR negativ	2	10

0,97 PPV (positiv prædiktiv værdi)
0,83 NPV (negativ prædiktiv værdi)

0,94 0,91

Følsomhed Specificitet

Af de testede prøver indeholdt 0,8% PCR-hæmmere som rapporteret af IAC, efter ekstraktion ved hjælp af MycXtra® sættet.

Påvisning af *Pneumocystis jirovecii*

Kliniske prøver indsamlet ved Bronkoalveolær lavage (BAL), der var blevet indsamlet fra 2 hospitaler, ekstraheret ved hjælp af MycXtra® sættet og opbevaret, blev brugt til at evaluere præstationen af MycAssay™ *Pneumocystis* sættet. Resultaterne fra PCR-metoden blev sammenlignet med immunofluorescent mikroskopi.

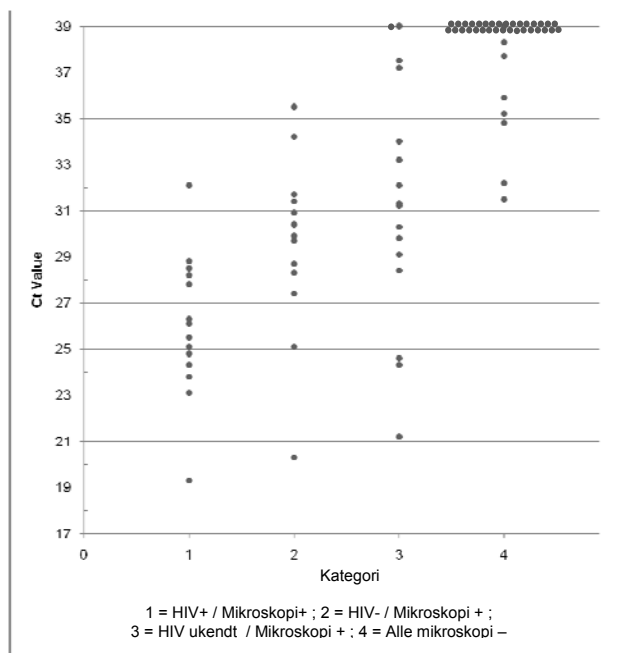
PCR v mikroskopi-diagnose

	Mikroskopi positiv	Mikroskopi negativ
PCR positiv	45	8
PCR negativ	2	33

0,85 PPV
(positiv prædiktiv værdi)
0,94 NPV (negativ prædiktiv værdi)

0,96 Følsomhed
0,80 Specificitet

Tabellen repræsenterer data indhentet fra patienter med diagnosticeret HIV, patienter der ikke er inficeret med HIV og patienter med ubestemt HIV-status. Patienter med *Pneumocystis*-lungebetændelse har meget varierende mængder af påviselige organismer; jo lavere Ct-værdi desto højere sandsynlighed for sygdom. Patienter med HIV og *Pneumocystis*-lungebetændelse har tendens til at have større antal af påviselige organismer end patienter, der ikke er inficeret med virussen, men der er en betydelig overlappning. Spredningsdiagrammet i Figur 3 viser denne overlappning. For fuldkommenhedens skyld, da datasættet i tabellen omfattede patienter, hvis HIV-status var ukendt, er spredningsdiagrammet for denne gruppe inkluderet i Figur 3 (søjle 3):



Figur 3: Spredningsdiagram med Ct-værdier fra DNA ekstraheret fra patientrespirationsprøver. Der er beskrevet fire grupper.



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

