

MycXtra®

Pilz-DNA Extraktions-Kit

REF 080-005

Vorgesehener Verwendungszweck

Der MycXtra® Pilz-DNA Extraktions-Kit ist für die Isolation und Reinigung von Pilz-DNA aus humaner bronchoalveolärer Lavage (BAL), Sputum und anderen Proben aus dem unteren Respirationstrakt bestimmt.

Informationen zum Test

Der Kit ist bestimmt zur Isolation von Pilz-DNA aus Proben des unteren Respirationstrakts von Patienten, bei denen eine Pilzinfektion vermutet wird. Die Extraktion der Pilz-DNA ist ein kritischer erster Schritt in der Analyse einer Probe auf Pilz-spezifische DNA. Da es schwierig ist, die Zellwände von Pilzen aufzuschließen, ist eine Kombination von Verfahren für die Optimierung der Ausbeute notwendig: unmittelbare Einwirkung mechanischer Kräfte in Puffer, gefolgt von mehreren Reinigungsschritten zur Entfernung von Substanzen, die die PCR inhibieren, sowie von Zellwand- und humanen Matrixkomponenten, worauf sich eine Elution in Puffer anschließt. Die Qualität der so gereinigten DNA ist für die Analyse durch Real-Time-PCR geeignet.

Testprinzip

Die in der Probe vorhandenen Pilzsporen und -hyphen werden durch Zentrifugation ankonzentriert und in einem kleinen Volumen resuspendiert. Die Probe wird dann in ein Bead-Beating-Röhrchen, das Kugeln, Lyselösung, Beadlösung und Inhibitor Removal Solution (IRS) enthält, hineingegeben. Das Prinzip besteht in dem Aufschluss der Mikroorganismen in der Probe durch eine Kombination aus Detergenz und der Einwirkung mechanischer Kräfte durch spezielle Kugeln (Beads). Die zellulären Komponenten werden durch die mechanische Bewegung auf einem Laborschüttler (Vortex) lysiert. Die aus den lysierten Zellen freigesetzte DNA wird an einen Silika-Zentrifugenfilter gebunden. Nach Waschen des Filters wird die DNA in einer Pufferlösung eluiert und kann für nachfolgende PCR-Analysen verwendet werden.

Kit-Inhalt

- Der Kit enthält genug Reagenzien für 10 Patientenproben.

| <u>Beschreibung</u> | <u>Volumen (mL)</u> |
|----------------------------------|---------------------|
| 10 Bead-Solution-Röhrchen (2 mL) | 0,55 |
| Lösung S1 | 0,65 |
| IRS-Lösung | 2,2 |
| Lösung S2 | 2,75 |
| Lösung S3 | 14,5 |
| Lösung S4 | 3,3 |
| Lösung S5 | 1,1 |

- 10 Zentrifugenfilter-Einheiten in 2-mL-Röhrchen
- 40 Mikrozentrifugen-Röhrchen (2 mL)
- Gebrauchsanweisung

Lagerung

Der Kit sollte bis zum Verfallsdatum, das auf dem Etikett der Schachtel angegeben ist, bei Raumtemperatur (15–30 °C) gelagert werden. Danach sollte er gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Kit ist zur Verwendung durch Laborfachpersonal vorgesehen. Zur aerosolfreien Handhabung der klinischen Proben sind die Methoden und Verfahren sowie die Sicherheitsausrüstungen und Einrichtungen der biologischen Sicherheitsstufe 2 anzuwenden. Alle Tätigkeiten, bei denen Aerosole erzeugt werden, müssen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II oder III durchgeführt werden. In klinischen Proben können pathogene Mikroorganismen enthalten sein, unter anderem Hepatitis-Viren und das Humane Immundefizienz-Virus (HIV). Beim Umgang mit durch Blut oder andere Körperflüssigkeiten kontaminierten Gegenständen sind die geltenden Standard-Sicherheitsmaßnahmen und die Labor-Richtlinien eingehalten werden. Der Kit enthält geringe Mengen von: Ethanol, Natrium-Dodecylsulfat (SDS), Guanidinhydrochlorid und Guanidinisothiocyanat. Ein Material-Sicherheitsdatenblatt (MSDS) kann von Myconostica Ltd. bezogen werden.

Zusätzlich benötigte Laborgeräte

- Mikrozentrifuge (10.000 x g)
- Universal-Zentrifuge
- Mikropipetten mit sterilen Filterspitzen (benötigter Volumenbereich: 40–1000 µL),
- Laborschüttler Vortex-Genie 2 (von Scientific Industries Inc.; kann auch von lokalen Anbietern bezogen werden)
- Adapterplatte für Vortex-Laborschüttler (von Myconostica erhältlich, REF-Nr. 080-015) zum gleichzeitigen Schütteln mehrerer Röhrchen auf dem Vortex-Schüttler

Hinweise zur Durchführung

Die Probenverarbeitung mit dem Kit dauert ungefähr 1,5 Stunden. Wenn es sich um eine Sputumprobe handelt oder um eine BAL-Probe hoher Viskosität, muss eine zusätzliche Vorbehandlung der Proben durchgeführt werden. Diese ist im Abschnitt „Protokoll für Sputum und andere viskose Proben des Respirationstrakts“ weiter unten beschrieben.

Lesen Sie bitte das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Probenverarbeitung beginnen. Tragen Sie während der gesamten Prozedur Einmal-Laborhandschuhe. Alle Röhrchen müssen verschlossen sein, wenn Reagenzien auf dem Vortex-Schüttler gemischt werden. Verwenden Sie Mikroliter-Pipetten für den Transfer von Flüssigkeiten. Achten Sie darauf, dass die Röhrchen entsprechend beschriftet sind, wenn mehrere Patientenproben verarbeitet werden.

Protokoll für klare, dünnflüssige BAL-Proben

Hinweis: Falls die extrahierte DNA anschließend mit einem Myconostica MycAssay™ Kit weiterverarbeitet wird, empfehlen wir, das Protokoll mit einem Ausgangsvolumen von ≥ 2 mL BAL zu beginnen.

1. Zentrifugieren Sie die BAL-Probe für 20 Minuten bei 3000 x g. Dekantieren Sie den Überstand in ein neues Röhrchen.
2. Pipettieren Sie 800 µL des abgegossenen Überstands wieder zu dem Pellet hinzu, resuspendieren Sie es und überführen Sie die Suspension in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen (im Lieferumfang enthalten).
3. Zentrifugieren Sie für 2 Minuten bei 10.000 x g und entfernen Sie dann den Überstand. Resuspendieren Sie das Pellet in der im Röhrchen verbliebenen Lösung und überführen Sie die gesamte Suspension in ein 2-mL-Bead-Solution-Röhrchen.
4. Zum Mischen mehrmals vorsichtig umdrehen.
5. **Überprüfen Sie Lösung S1.** Sollte Lösung S1 einen Niederschlag aufweisen, wärmen Sie das Röhrchen in der Hand an schütteln Sie es (Vortex), um den Niederschlag aufzulösen.
6. Pipettieren Sie 60 µL Lösung S1 in das Bead-Solution-Röhrchen und mischen Sie durch mehrmaliges Umdrehen oder kurzes Schütteln (Vortex).
7. Pipettieren Sie 200 µL Inhibitor Removal Solution (IRS) in das Bead-Solution-Röhrchen.
8. Befestigen Sie das/die Bead-Röhrchen horizontal auf einer Vortex-Adapterplatte (von Myconostica erhältlich, REF-Nr. 080-015). Für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit schütteln.
9. Zentrifugieren Sie das/die Bead-Solution-Röhrchen für 30 Sekunden bei 10.000 x g. **ACHTUNG:** Vergewissern Sie sich, dass nicht mit mehr als 10.000 x g zentrifugiert wird, da sonst die Röhrchen zerbrechen könnten. Die 2-mL-Röhrchen müssen frei – ohne zu scheuern – in der Zentrifuge rotieren.
10. Überführen Sie 450 µL des Überstands in ein sauberes Mikrozentrifugen-Röhrchen (im Lieferumfang enthalten); achten Sie darauf, dass dabei die Beads nicht aufgewirbelt werden. Verwerfen Sie das Bead-Solution-Röhrchen.
11. Pipettieren Sie 250 µL Lösung S2 zum Überstand und schütteln Sie für 5 Sekunden (Vortex). Inkubieren Sie anschließend für 5 Minuten bei 4–8 °C.
12. Zentrifugieren Sie die Röhrchen für 1 Minute bei 10.000 x g.
13. Überführen Sie den gesamten Überstand – OHNE das Pellet – in ein neues, sauberes Mikrozentrifugen-Röhrchen (im Lieferumfang enthalten).
14. Pipettieren Sie vorsichtig 1,1 mL (2 x 550 µL) Lösung S3 zum Überstand hinzu (vorsichtig, weil das Röhrchen fast voll ist). Mischen Sie durch mehrmaliges Umdrehen des Röhrchens.
15. Geben Sie ca. 650 µL davon auf einen Zentrifugenfilter und zentrifugieren Sie für 30 Sekunden bei 10.000 x g. Verwerfen Sie den Durchfluss und tragen Sie erneut 650 µL Überstand auf den Zentrifugenfilter auf. Zentrifugieren sie erneut für 30 Sekunden bei 10.000 x g. Wiederholen Sie dies, bis der gesamte Überstand durch den Filter zentrifugiert wurde. **Hinweis:** Für jede Probe sind insgesamt drei Filtrationen erforderlich. Führen Sie die letzte Zentrifugation für 1 Minute bei 10.000 x g durch und verwerfen Sie den Durchfluss.
16. Pipettieren Sie 300 µL Lösung S4 auf den Zentrifugenfilter und zentrifugieren Sie für 30 Sekunden bei 10.000 x g.
17. Verwerfen Sie den Durchfluss.
18. Zentrifugieren Sie erneut für 1 Minute, um letzte Spuren von Lösung S4 (inhibiert die PCR-Reaktion) zu entfernen.
19. Überführen Sie den Zentrifugenfilter sorgfältig in ein neues, sauberes Mikrozentrifugen-Röhrchen (im Lieferumfang enthalten). Vermeiden Sie eine Verschleppung von Lösung S4 auf dem Zentrifugenfilter.
20. Tragen Sie vorsichtig 40 µL Lösung S5 auf die Mitte der weißen Zentrifugenfiltermembran auf. Lassen Sie die Lösung für 2 Minuten bei Raumtemperatur einwirken.

21. Zentrifugieren Sie für 30 Sekunden bei 10.000 x g.
22. Verwerfen Sie den Zentrifugenfilter. Die im Röhrchen befindliche eluierte DNA kann nun in einer PCR-Applikation verwendet werden. Die DNA kann für bis zu fünf Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden; für eine längere Lagerung sollte die DNA bei -20 °C eingefroren werden.
23. Bis zu 10 BAL-Proben können mit dem Kit verarbeitet werden. Falls bei einer DNA-Präparation nicht alle Komponenten verbraucht werden, stellen Sie diese Kit-Komponenten zur Aufbewahrung wieder in die Originalschachtel zurück. Verwenden Sie keine Komponenten mit unterschiedlichen Chargennummern.
24. Nach Abschluss der Probenverarbeitung sollten die verwendeten Kit-Komponenten gemäß den geltenden örtlichen Gesundheits-, Sicherheits- und Umweltschutz-Richtlinien entsorgt werden.

Protokoll für Sputum und andere viskose respiratorische Proben

Es wird empfohlen, den BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/Decontamination Kit (Kat.-Nr. 240862) zur Vorbehandlung von mykobakteriellen Proben zu verwenden, um sie für die DNA-Präparation nach diesem MycXtra® Protokoll für Sputumproben vorzubereiten. Das nachfolgende Protokoll ist modifiziert, um die Anforderungen des MycXtra® Kits an die Qualität der Ausgangsproben zu erfüllen.

Vorsichtsmaßnahmen

Das NALC-NaOH-Reagenz in dem BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/ Decontamination Kit zur Vorbehandlung mykobakterieller Proben enthält ein stark alkalisches Reagenz, das schwere Verätzungen verursachen kann. Ziehen Sie damit kontaminierte Kleidung sofort aus. Tragen Sie im Umgang mit diesem Reagenz immer Handschuhe sowie Augen- bzw. Gesichtsschutz. NaOH wirkt reizend auf Augen und Haut. Nach versehentlichem Augen- oder Hautkontakt sofort mit einem Augenspül-System oder Leitungswasser für mindestens 15 Minuten spülen und einen Arzt aufsuchen. Bei Verschlucken sofort Milch, Eiweiß oder große Mengen Wasser zu sich nehmen und einen Arzt aufsuchen.

Vorsicht: Brechen Sie die Ampulle nahe der Mitte nur einmal auf. Danach die Ampulle nicht weiter manipulieren, da sonst die umgebende Plastikflasche durchstoßen werden kann und die Gefahr einer Verletzung besteht.

Lagerungsbedingungen: Nach Empfang den Kit bei 15–30 °C lagern. Nicht einfrieren. Nicht vor Gebrauch öffnen.

Produktbeschädigung: Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn die Ampullen bereits zerbrochen sind oder andere sichtbare Beschädigungen vorliegen. Verwenden Sie den Phosphatpuffer nicht, wenn die Packungen aufgerissen oder unverschlossen sind.

Durchführung

1. Setzen Sie die BBL™ MycoPrep™ Phosphatpuffer-Lösung an. Geben Sie den Inhalt einer Portionspackung Phosphatpuffer in ein Glasgefäß mit Schraubverschluss und füllen Sie mit Wasser von einer für die Molekularbiologie geeigneten Qualität auf 500 mL auf. Sterilisieren Sie den Puffer mit offener Schraubkappe für 15 Minuten bei 121 °C in einem Autoklaven. Lassen Sie anschließend auf Raumtemperatur abkühlen und drehen Sie die Schraubkappe fest.
2. Öffnen Sie vorsichtig den Schraubverschluss der BBL™ MycoPrep™ Reagenzienflasche. Die Ampulle in der Flasche ausfindig machen und fixieren; pressen Sie die überschüssige Luft aus der Flasche und drehen Sie den Verschluss fest zu. Die Flasche in aufrechter Position halten und drücken, bis die Ampulle zerbricht. Schütteln Sie die Flasche leicht, um das NALC aufzulösen. Vermeiden Sie übermäßiges Schütteln. DAS REAGENZ MUSS NACH DEM ZERBRECHEN DER AMPULLE INNERHALB VON 24 STUNDEN VERWENDET WERDEN.
3. In einer biologischen Sicherheitswerkbank (mindestens der Klasse II) werden die Probe und die aktivierte NALC-NaOH-Lösung, in der doppelten Menge des geschätzten Sputumvolumens, in ein graduiertes 50-mL-Zentrifugenröhrchen gegeben. Zum Beispiel: Geben Sie 4 mL aktivierte NALC-NaOH-Lösung zu ca. 2 mL Probe.
4. Verschließen Sie das Zentrifugenröhrchen und mischen Sie so lange auf einem Vortex-Schüttler, bis sich die Probe aufgelöst hat. Falls die Probe besonders viskos ist, geben Sie mehr NALC-NaOH-Lösung dazu und mischen Sie erneut.
5. Lassen Sie die Mischung für 15 Minuten unter gelegentlichem leichtem Schütteln bei Raumtemperatur stehen.
6. Füllen Sie das Zentrifugenröhrchen mit dem gebrauchsfertigen Phosphatpuffer bis zur 35-mL-Marke auf und mischen Sie. Zentrifugieren Sie für 20 Minuten bei 3.000 x g.
7. Dekantieren Sie vorsichtig den gesamten Überstand. Entfernen Sie Reste des noch im Röhrchen verbliebenen Überstands vorsichtig mit einer Mikropipette.
8. Pipettieren Sie 800 µL des gebrauchsfertigen Phosphatpuffers hinzu und resuspendieren Sie das Sediment. Überführen Sie den gesamten Inhalt in ein Mikrozentrifugenröhrchen.
9. Setzen Sie die DNA-Extraktion ab hier mit Schritt 3 des Protokolls für klare, dünnflüssige BAL-Proben fort.

Leistungsmerkmale und Anwendungseinschränkungen

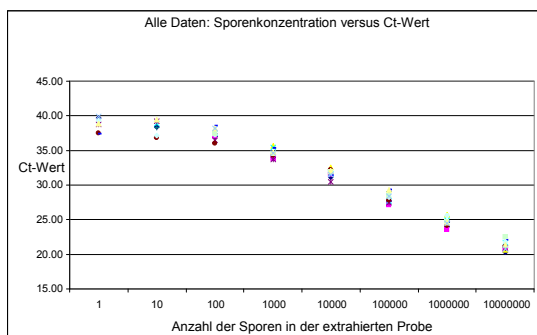
Analytische Selektivität

Unter Verwendung des MycXtra® Kits wurde die DNA aus klinischen BAL-, Sputum- und anderen respiratorischen Proben extrahiert, in denen zuvor über die Kultur oder durch Mikroskopie die folgenden Organismen identifiziert worden waren: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.* und *Pneumocystis jirovecii*. Die DNA wurde unter Verwendung des Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) Kits für den schnellen Nachweis von *Aspergillus*- und *Pneumocystis*-DNA in klinischen respiratorischen Proben mittels Real-Time-PCR nachgewiesen.

Entfernung interferierender Substanzen

Die bei der Behandlung respiratorischer Erkrankungen verbreiteten Arzneimittel wie beispielsweise Tobramicin, Colistinsulfat, Dornase (DNase), Salmeterol und andere Substanzen, wie z. B. physiologische Kochsalzlösung (0,9 %), Heparin und Tanninsäure, können Real-Time-PCR-Assays inhibieren. Diese Substanzen werden durch den MycXtra® Extraktionsprozess vollständig entfernt. Untersuchungen zur Leistungsbewertung mit klinischen Proben ergaben, dass einige PCR-Inhibitoren in respiratorischen Patientenproben vorkommen. Die Art dieser Inhibitoren, die während des Extraktionsverfahrens nicht entfernt werden, ist allerdings unbekannt.

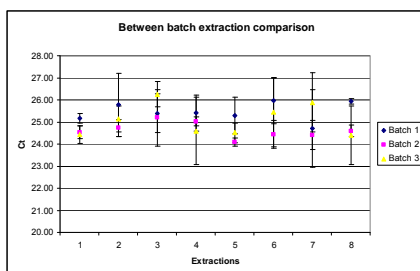
Nachweisgrenzen und Wiederholbarkeit



Mit dem MycXtra® Kit wurde DNA aus unterschiedlich konzentrierten Sporen-Proben extrahiert (bis auf 10 Sporen verdünnt). Die Extraktionen der *Aspergillus-fumigatus*-Sporen in Kochsalzlösung wurden von zwei Labormitarbeitern über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt. Die DNA wurde mit dem Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) Kit nachgewiesen, der eine Nachweisgrenze von ungefähr 1 Genom *A. fumigatus* aufweist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Der Gesamtvariationskoeffizient wurde zu 2,4 % berechnet. Die durchschnittliche Extraktionseffizienz betrug 8%.

Abbildung 1. Konzentration der *Aspergillus-fumigatus*-Sporen versus Ct-Wert bei der Real-Time-PCR

Reproduzierbarkeit



24 separate DNA-Extraktionen aus einer Standard-Suspension von *Aspergillus fumigatus* wurden mit drei Chargen des MycXtra® Kits durchgeführt. Danach erfolgte eine Real-Time-PCR, unter Verwendung des Myconostica FXG™ : RESP (Asp +) Kits, zur Bestimmung der Inter- und Intra-Chargen-Variation der DNA-Extraktion aus *Aspergillus fumigatus*. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2. Inter- und Intra-Chargen-Variation der DNA-Extraktion

Leistungsbewertung

Nachweis von *Aspergillus*-Spezies

Zur Leistungsbewertung des MycAssay™ *Aspergillus*-Kits wurden in zwei Kliniken Proben aus dem Respirationstrakt (BAL-Proben) entnommen. Aus diesen wurde dann unter Verwendung des MycXtra® Pilz-DNA Extraktions-Kits die DNA extrahiert, die anschließend gelagert und dann im Assay analysiert wurde. Die Ergebnisse wurden mit der klinischen Diagnose verglichen.

Nach Auswertung eines Datenbestands, der anhand von Proben an verschiedenen Standorten und mit unterschiedlichen Patientenpopulationen gewonnen worden war, wurde der Cut-off bei einem Ct-Wert von 36,0 festgelegt. Verschiedene Cut-off-Werte wurden hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, mit der zwischen einer Erkrankung und einem Zustand ohne Erkrankung differenziert werden kann, evaluiert.

PCR vs. klinische Diagnose

| | klinisch positiv | klinisch negativ | | |
|-------------|------------------|------------------|------|-----|
| PCR positiv | 31 | 1 | 0,97 | PPW |
| PCR negativ | 2 | 10 | 0,83 | NPW |
| | 0,94 | 0,91 | | |
| | Sensitivität | Spezifität | | |

Von den analysierten Proben enthielten nach DNA-Extraktion mit dem MycXtra® Kit 0,8 % PCR-Inhibitoren, wie anhand der Ergebnisse der IAC-Proben festgestellt wurde.

Nachweis von *Pneumocystis jirovecii*

Zur Leistungsbewertung des MycAssay™ *Pneumocystis*-Kits wurden in zwei Kliniken Proben durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen. Aus diesen wurde dann unter Verwendung des MycXtra® Pilz-DNA Extraktions-Kits die DNA extrahiert, die anschließend gelagert und dann im Assay analysiert wurde. Die erhaltenen PCR-Ergebnisse wurden mit denen der Immunfluoreszenzmikroskopie verglichen.

PCR vs. mikroskopische Diagnose

| | Mikroskopie positiv | Mikroskopie negativ | | |
|-------------|---------------------|---------------------|------|-----|
| PCR positiv | 45 | 8 | 0,85 | PPW |
| PCR negativ | 2 | 33 | 0,94 | NPW |
| | 0,96 | 0,80 | | |
| | Sensitivität | Spezifität | | |

Die in der Tabelle wiedergegebenen Daten entstammten Proben, die Patienten mit diagnostizierter HIV-Infektion, Patienten ohne HIV-Infektion und Patienten mit unbestimmtem HIV-Status entnommen worden waren. Bei Patienten mit einer *Pneumocystis*-Pneumonie können stark variierende Mengen an Organismen nachgewiesen werden; je niedriger der Ct-Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass eine Erkrankung vorliegt. Bei Patienten mit HIV und *Pneumocystis*-Pneumonie wird tendenziell eine höhere Anzahl an Organismen nachgewiesen als bei Patienten, die nicht mit dem Virus infiziert sind; allerdings ist die Überlappung beträchtlich. Die Punktwolke („Scatter-Plot“) in der folgenden Abbildung 3 zeigt diese Überlappung. Der Vollständigkeit halber, da die Daten in der Tabelle auch Patienten mit unbekanntem HIV-Status einschlossen, wurde auch die Punktwolke für diese Gruppe in Abbildung 3 mit aufgenommen (siehe Säule 3).

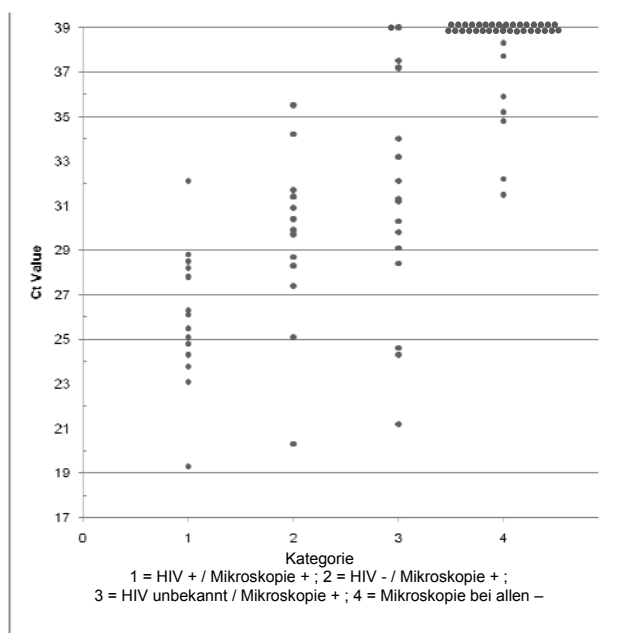


Abbildung 3: Punktwolke („Scatter-Plot“) mit den Ct-Werten der DNA-Proben, die aus Patientenproben des Respirationstrakts extrahiert wurden. Vier Patientengruppen sind beschrieben.



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

