

MycXtra® Fungal DNA Extraction Kit

REF 080-005

Avsedd användning

MycXtra® Fungal DNA Extraction Kit är avsett till isolering och rening av fungalt DNA i humant bronkoalveolärt lavage (BAL), sputum och andra prover från de nedre luftvägarna.

Sammanfattning och förklaring

Kitet är utformat för isolering av fungalt DNA från nedre luftvägarna hos patienter med misstänkt svampinfektion. Extraktion av fungalt DNA är ett kritiskt första steg vid analys av ett prov med avseende på svampspecifikt DNA. Eftersom svampcellväggar är svåra att bryta ned, krävs en kombination av processer för att optimera utbytet: direkta mekaniska krafter i bufferten, följt av flera reningssteg för att avlägsna PR-inhiberande ämnen, cellväggar och humana matriskomponenter, följt av eluering i buffert. Kvaliteten på renat DNA är lämplig för PCR-analys i realtid.

Procedurens principer

Svampsporer och hyfer i provet koncentreras genom centrifugering och återsuspenderas i en liten volym. Provet tillsätts sedan till ett rör med kulor, lyserande lösning, lösning för kulorna och en lösning för avlägsnande av inhibitorer. Principen är att lysera mikroorganismerna i provet genom en kombination av detergent och mekanisk kraft mot speciella kulor. Cellkomponenterna lyseras mekaniskt på verkan med hjälp av en vortexblandare. Från de lyserade cellerna binds frisatt DNA till ett kiselsyra-centrifugfilter. Filtret tvättas, och DNA återvinns i en buffrad lösning och kan nu användas till en följande PCR-analys.

Kitinnehåll

- Tillräckligt för 10 patientprover

Beskrivning	Volym (mL)
10 x 2 mL Bead Solution-rör (kulor i lösning)	0,55
Lösning S1	0,65
IRS-lösning	2,2
Lösning S2	2,75
Lösning S3	14,5
Lösning S4	3,3
Lösning S5	1,1

- 10 x centrifugfilterenheter i 2 mL rör
- 40 x mikrocentrifugrör (2 mL)
- Bruksanvisning

Förvaring

Kitet ska förvaras vid rumstemperatur (15 till 30 °C) fram till det utgångsdatum som anges på kitlådans etikett. Efter detta datum ska kitet kastas enligt gällande bestämmelser.

Varningar och försiktighetsåtgärder

Kitet är avsett att användas enbart av utbildad laboratoriepersonal. För att undvika aerosolbildning vid hantering av kliniska prover måste metoder och procedurer samt utrustning och lokaler uppfylla Biosafety level 2 (biosäkerhetsnivå 2). Alla aerosolproducerande aktiviteter måste utföras i ett biologiskt säkerhetsskåp klass I eller II. Patogena mikroorganismer som exempelvis hepatitvirus och HIV-virus kan förekomma i kliniska prover. Accepterade försiktighetsåtgärder och lokala riktlinjer ska följas vid hantering av alla föremål som förorenats av blod eller andra kroppsvätskor. Kitet innehåller små mängder av etanol, natriumdodecylsulfat, guanidinehydroklorid och guanidinisotiocyanat. Ett säkerhetsdatablad (Material Safety Data Sheet, MSDS) kan rekvideras från Myconostica Ltd.

Utrustning som behövs

- Mikrocentrifug (10 000 x g)
- Standardcentrifug
- Mikropipetter med sterila filterspetsar (volym 40 µL–1 000 µL),
- Blandare Vortex Genie 2 (Scientific Industries, men tillgänglig från lokala leverantörer)
- Vortex-adapterplatta (från Myconostica, REF 080-015) för att fästa rören på blandaren.

Anmärkningar till proceduren

Processen tar ungefär 1,5 timmar. Om provet är sputum eller om ett BAL-prov ser visköst ut behövs ytterligare förbehandling. Detta beskrivs i avsnittet "Procedur för sputum eller andra viskösa prover från luftvägarna" nedan.

Läs hela protokollet innan du börjar arbeta. Använd alltid handskar. Alla rör måste vara tillslutna under vortexblandning. Använd mikropipetter vid överföring av vätskor. Var noga med att märka rören på lämpligt sätt om flera patientprover bearbetas.

Procedur för klara, lättflytande BAL-prover

Anm.: Om extraherat DNA senare ska användas med en Myconostica MycAssay™-produkt, rekommenderar vi att starta med ≥2 mL BAL.

1. Centrifugera BAL-provet i 20 min vid 3 000 x g. Dekanter supernatanten och behåll den.
2. Återför 800 µL av den behållna supernatanten till pelleten, återsuspendera och överför till mikrocentrifugrör (medföljer).
3. Centrifugera i 2 min vid 10 000 x g och avlägsna all supernatant. Återsuspendera pelleten i den återstående lösningen i röret och för över hela mängden till ett 2 mL Bead Solution-rör.
4. Vänd försiktigt på röret för att blanda.
5. **Kontrollösning S1.** Om lösningen S1 har en fällning, värmer du röret i händerna och vortexbländar tills allt är löst.
6. Tillsätt 60 µL S1 till Bead Solution-röret och vänd flera gånger eller vortexbländar kort.
7. Tillsätt 200 µL Solution IRS (lösning för avlägsnande av inhibitorer) till Bead Solution-röret.
8. Fixera Bead Solution-röret (eller rören) horisontellt på en vortex-adapterplatta (kan beställas från Myconostica, REF 080-015). Vortexbländar vid maximal hastighet i 10 min.
9. Centrifugera Bead Solution-rören vid 10 000 x g i 30 s. **OBS!** Var noga med att inte överskrida 10 000 x g. Rören kan gå sönder vid högre värden. Kontrollera att 2 mL-rören roterar fritt i centrifugen utan gnidning.
10. Överför 450 µL supernatant till ett rent mikrocentrifugrör (medföljer). Var noga med att inte rubba kulorna. Kasta Bead Solution-röret.
11. Tillsätt 250 µL Solution S2 till supernatanten och vortexbländar i 5 s. Inkubera vid 4–8 °C i 5 min.
12. Centrifugera rören i 1 min vid 10 000 x g.
13. Överför hela supernatantvolymen till ett rent mikrocentrifugrör (medföljer) utan att rubba pelleten.
14. Tillsätt 1,1 mL (2 x 550 µL) Solution S3 till supernatanten (var försiktig, eftersom röret är nästan fullt). Blanda genom att vända på röret.
15. Överför ungefär 650 µL till ett centrifugfilter och centrifugera vid 10 000 x g i 30 s. Kasta genomflödet, tillsätt ytterligare 650 µL supernatant till filtret och centrifugera vid 10 000 x g i 30 s. Upprepa tills all supernatant har passerat genom centrifugfiltret. **Anm.:** Totalt tre överföringar behövs för varje prov. Centrifugera vid 10 000 x g i 1 min vid den sista centrifugeringen. Kasta genomflödet.
16. Tillsätt 300 µL Solution S4 till centrifugfiltret och centrifugera i 30 s vid 10 000 x g.
17. Kasta genomflödet.
18. Centrifugera igen i 1 min för att avlägsna de sista spåren av S4, som annars skulle inhibera PCR-reaktionen.
19. Placera försiktigt centrifugfiltret i ett nytt, rent mikrocentrifugrör (medföljer) Undvik carryover av S4 till centrifugfiltret.
20. Tillsätt försiktigt 40 µL Solution S5 till mitten av det vita centrifugfiltermembranet. Låt stå vid rumstemperatur i 2 min.
21. Centrifugera i 30 s vid 10 000 x g.
22. Kasta centrifugfiltret. DNA i röret är nu klart för användning i en PCR-procedur. Förvara vid 2–8 °C i högst 5 dagar, eller spara DNA nedfruset vid –20 °C.
23. Upp till 10 BAL-prover kan behandlas. Om inte alla komponenter används vid ett tillfälle ska det oanvända läggas tillbaka i originallådan. Blanda inte olika loter.
24. När arbetet är klart ska använda kitkomponenter kastas enligt gällande regler för hälsa, säkerhet och miljö.

Procedur för sputum eller andra viskösa prover från luftvägarna

Kitet BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/ Decontamination Kit for Processing of Mycobacterial Specimens (Kat. nr. 240862) bör användas tillsammans med MycXtra®-protokollet vid förbehandling av sputumprover. Proceduren nedan är modifierad för att passa MycXtra®-kitets krav på material.

Försiktighetsmått:

NALC-NaOH-reagenset i BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/ Decontamination Kit for Processing of Mycobacterial Specimens innehåller starka alkalier som kan orsaka svåra kemiska brännskador. Ta omedelbart av alla förorenade kläder vid spill. Handskar och ansiktsskydd måste alltid användas. NaOH irriterar ögon och hud. Vid ögon- eller hudkontakt, skölj omedelbart med ögondusch eller kranvatten i minst 15 min och rådfråga läkare. Vid nedsväljning, drick mjölk, äggvita eller stora mängder vatten och rådfråga läkare.

Försiktighet: Bryt ampullen nära dess centrum och endast en gång. Hantera inte ampullen ytterligare eftersom plastflaskan kan punkteras så att skador uppstår.

Förvaring: Förvaras efter mottagandet vid 15–30 °C. Får inte frysas. Öppna inte förpackningar innan de är klara att användas.

Produktförsämring: Använd inte reagenser om ampullerna är brutna eller om det finns synliga tecken på försämring. Använd inte fosfatbufferten om förpackningarna är upprivna eller utan försegling.

Procedur

1. Förbered BBL™ MycoPrep™ Phosphate Buffer Solution. Häll innehållet i en fosfatbuffertpåse i en glasbehållare med skruvlock och fyll till 500 mL-strecket med vatten av molekylärbiologiskvalitet. Sterilisera med lossat lock i autoklav vid 121 °C i 15 min. Kyl till rumstemperatur och dra fast locket.
2. Lossa försiktigt skruvlocket på BBL™ MycoPrep™ Reagent-flaskan. Lokalisera ampullen i flaskan, krama ut överskott av luft ur flaskan och dra åt locket. Håll flaskan upprätt och krama den tills ampullen bryts. Skaka försiktigt för att lösa upp NALC. Skaka inte för mycket. **NÅR AMPULLEN BRUTITS SKA REAGENSET ANVÄNDAS INOM 24 TIMMAR.**
3. Arbeta i ett biologiskt säkerhetsskåp (minst klass 2). Till ett graderat 50 mL centrifugrör med skruvlock sätts provet och dubbla mängden aktiverad NALC-NaOH-lösning genom att uppskatta mängden sputum. Exempel: tillsätt 4 mL aktiverad NALC-NaOH-lösning till ungefär 2 mL prov.
4. Tillslut centrifugröret och blanda på en vortexblandare tills provet solubiliseras. Om provet är mycket visköst tillsätter du mer NALC-NaOH-lösning och upprepar blandningen.
5. Låt blandningen stå vid rumstemperatur i 15 min. Skaka försiktigt då och då.
6. Tillsätt den förberedda fosfatbufferten till centrifugrörets 35 mL-märke och blanda. Centrifugera i 20 min vid 3 000 x g.
7. Dekantera försiktigt av all supernatant. Avlägsna försiktigt eventuellt icke dekanterad supernatant med en mikropipett.
8. Tillsätt 800 µL av den förberedda fosfatbufferten och återsuspendera sedimentet. Överför hela mängden till ett mikrocentrifugrör.
9. Följ BAL-proceduren från steg 3.

Egenskaper och begränsningar

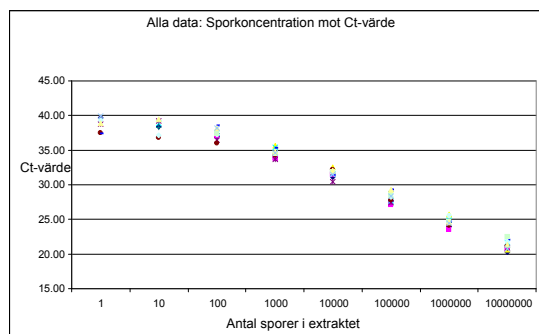
Analytisk selektivitet

Med användning av ett MycXtra® kit extraherades DNA från kliniskt BAL, sputum och andra prover från luftvägarna, från vilka följande organismer identifierats genom odling eller mikroskopi: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.* och *Pneumocystis jirovecii*. DNA detekterades med användning av Myconostica FXG™: RESP (Asp +) kit för snabb realtids-PCR av *Aspergillus*- och *Pneumocystis*-DNA i kliniska prover från luftvägarna.

Avlägsnande av störande ämnen

Vanliga läkemedel som används vid behandling av sjukdomar i andningsorganen är tobramycin, kolistinsulfat, Dornase (DNAs), salmeterol samt andra material som t.ex. fysiologisk koksaltlösning (0,9 %), heparin och garvsyra kan inhibera PCR-analyser i realtid. De avlägsnas fullständigt av MycXtra®-extraktionsprocessen. Utvärderingstester med kliniska prover tyder på att det i prover från luftvägarna finns vissa PCR-inhibitorer, oklart hurdana, som inte avlägsnas under extraktionsprocessen.

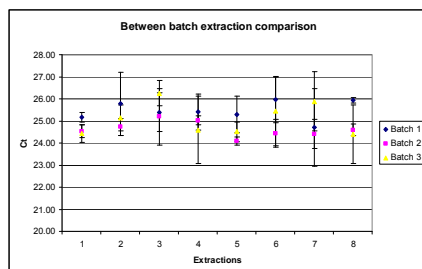
Detektionsgränser och repeterbarhet



DNA som extraherats med MycXtra® kit från prover som innehöll så få som 10 sporer. Extraktioner av *Aspergillus fumigatus*-sporer i saltlösning utfördes av 2 operatörer under 5 dagar. DNA detekterades med användning av Myconostica FXG™: RESP (Asp +) kit som har detektionsgränsen ungefär 1 *A. fumigatus*-genom. Resultaten visas i figur 1. Totala variationskoefficienten beräknades till 2,4 %. Medelvärdet för extraktionens effektivitet bestämdes till 8 %.

Figur 1. *Aspergillus fumigatus*-sporkoncentration mot Ct-värde från realtids-PCR

Reproducerbarhet



Tjugofyra separata extraktioner utfördes med användning av samtliga tre satser i MycXtra® kit och en *Aspergillus fumigatus*-standardsporsuspension. Realtids-PCR, med Myconostica FXG™: RESP (Asp +) kit, utfördes sedan för att bestämma variation mellan och inom satser för extraktion av *Aspergillus fumigatus*-DNA. Resultaten visas i figur 2.

Figur 2. Extraktionens variation mellan och inom satser

Prestandautvärdering

Detektering av *Aspergillus*-arter

BAL-prover från luftvägarna som insamlats från 2 sjukhus och extraherats med MycXtra®-kitet och förvarats, användes till att utvärdera prestanda för MycAssay™ *Aspergillus*-kitet med kliniska prover. Jämförelser gjordes med klinisk diagnos.

Tröskelvärdet för ett Ct-värde av 36,0 fastställdes efter en genomgång av en datauppsättning från prover som tagits från olika platser och olika patientpopulationer. Olika tröskelvärden utvärderades med avseende på sannolikheten för att skilja mellan sjukdomstillstånd och tillstånd utan sjukdom.

PCR jämfört med klinisk diagnos

	Kliniskt positiv	Kliniskt negativ		
PCR positivt	31	1	0,97	PPV
PCR negativt	2	10	0,83	NPV
	0,94	0,91		
	Sensitivitet	Specificitet		

Av de testade prover innehöll 0,8 % PCR-hämmare som rapporterat av IAC, efter extraktion med användning av MycXtra®-kitet.

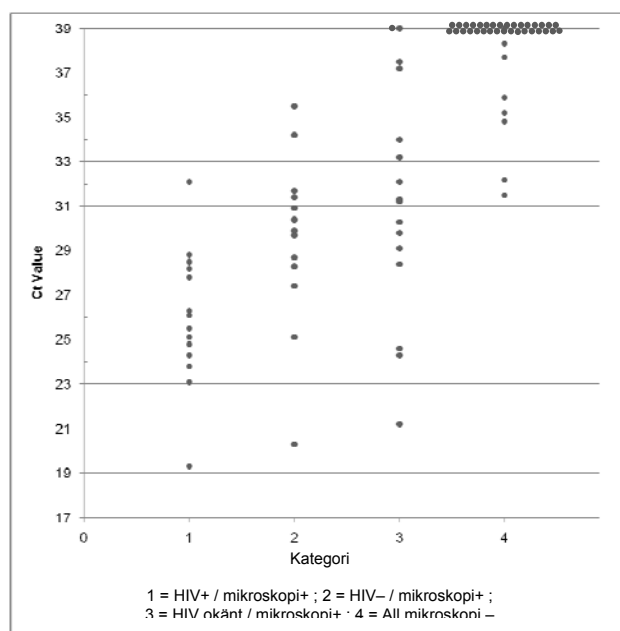
***Pneumocystis jirovecii*-detektering**

Prover från luftvägar (BAL) som insamlats från 2 sjukhus, extraherats med kitet MycXtra® och förvarats, användes för att utvärdera MycAssay™ *Pneumocystis* kit. PCR-resultaten jämfördes med immunfluorescensmikroskopi.

PCR jämfört med mikroskopidiagnos

	Mikroskopi positiv	Mikroskopi negativ		
PCR positivt	45	8	0,85	PPV
PCR negativt	2	33	0,94	NPV
	0,96	0,80		
	Sensitivitet	Specificitet		

Tabell 3 visar data från patienter med diagnosticerad HIV, patienter som inte varit infekterade med HIV samt patienter med obestämd HIV-status. Patienter med *Pneumocystis*-pneumoni har högre detekterbara organismhalter; ju lägre Ct-värde, desto högre sannolikhet för sjukdom. Patienter med HIV och *Pneumocystis*-pneumoni tenderar att ha ett större antal detekterbara organismer än patienter som inte är infekterade av viruset, men överlappningen är avsevärd. Punktdiagrammet i figur 3 nedan visar överlappningen. För fullständighetens skull är punktdiagrammet för patienter med okänt HIV-status medtaget i figur 3 (kolumn 3), eftersom denna grupp ingår i tabellen.



Figur 3: Punktdiagram för Ct-värden erhållna från DNA extraherat från patienters luftvägar. Fyra grupper beskrivs.



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-post: mycotech@myconostica.co.uk

