

MycAssay™ Aspergillus

Roche LightCycler® 2.0

Amostras Respiratórias

REF 080-045

Utilização prevista

MycAssay™ Aspergillus está indicado para a utilização por profissionais de laboratório qualificados para a detecção qualitativa do DNA genómico de *Aspergillus* spp. extraído de amostras respiratórias do tracto respiratório inferior (p. ex., amostras brônquicas) como ajuda no diagnóstico em doentes adultos com suspeita de infecção ou alergia por *Aspergillus*.

O MycAssay™ Aspergillus foi validado para utilização com o Roche LightCycler® 2.0.

Resumo e explicação

Aspergillus spp. são fungos ubíquos e oportunistas que provocam tanto síndromas alérgicas como invasivas. O género é abrangido por, aproximadamente, 300 espécies, das quais 41 foram associadas à doença humana. A maioria das infecções é causada por *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger*; com menor frequência foram implicados *A. nidulans* e outras espécies raras tais como *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. lentulus* e *A. pseudofischeri*¹. A maioria das infecções e alergias causadas por *Aspergillus* spp. afecta o tracto respiratório. As síndromas alérgicas incluem aspergilose broncopulmonar (ABPA) e sinusite *Aspergillus* alérgica e são habitualmente causadas por *A. fumigatus*. A aspergilose pulmonar crónica inclui aspergiloma, aspergilose pulmonar cavitária crónica e aspergilose fibrótica crónica. A aspergilose invasiva (AI) ocorre em grupos de doentes em risco, incluindo doentes tratados com corticosteróides e doentes com neutropenia ou disfunção fagocitária (i.e., doença granulomatosa crónica e infecção por HIV). Cerca de 80% dos casos de aspergilose invasiva envolve os pulmões².

O diagnóstico de rotina da aspergilose pulmonar invasiva inclui tomografia computadorizada (TAC), broncoscopia e lavagem broncoalveolar (microscopia e cultura), análises sanguíneas de antigénios de *Aspergillus* ou exame histológico de amostras de biopsia cirúrgica. Neste cenário, as culturas são com frequência falsamente negativas³. De facto, a lavagem broncoalveolar só é positiva por cultura em aproximadamente 40% dos casos, mesmo quando o diagnóstico é provado por outros meios^{4,5,6,7}, demonstrando a falta de sensibilidade da cultura na detecção da aspergilose invasiva e da aspergilose pulmonar crónica. As culturas são, no entanto, importantes se forem positivas uma vez que muitos testes de diagnóstico não indicam o género ou a espécie do fungo que causa a doença ou o perfil de susceptibilidade do isolado que causa a infecção.

A aspergilose broncopulmonar complica a asma e a fibrose quística⁸ e pode, raramente, apresentar-se sem doenças subjacentes. A maioria dos casos está associada a *A. fumigatus*, com outros fungos implicados ocasionalmente. A obstrução episódica das vias aéreas com tampões de esputo espesso de *Aspergillus* hyphae, IgE total sérica >1000 UI/mL e anticorpos IgE e IgG específicos de *Aspergillus fumigatus* detectáveis ou um teste de punção cutânea positivo para *Aspergillus* são as características da doença. As culturas de esputo podem ser positivas para *A. fumigatus* e podem ser observadas bronquiectasia numa TAC do tórax.

Os meios actuais de diagnóstico da aspergilose pulmonar crónica são uma mistura de radiologia (que não é específica)⁹ e serologia (anticorpos IgC contra *Aspergillus* ou precipitinas), que é positiva na maioria das formas de aspergilose (e, por conseguinte, não é específica para qualquer manifestação particular de aspergilose)¹. As culturas são positivas em

¹ Base de dados de espécies em www.aspergillus.org.uk

² Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Medical Mycology*; 43 (suppl. 1): S207-38.

³ Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infectious Diseases*; 9: 609-22.

⁴ Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respir Med*; 86: 243-8.

⁵ Greub G and Bille J. (1998) *Aspergillus* species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to determine significance. *Clin Microbiol Infect* 4: 710-716.

⁶ Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA, and the Mycoses Study Group. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*; 33:1824-33.

⁷ Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. (2002). Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients *The Journal of Infectious Diseases*. 186:1297-306.

⁸ Tillie-Leblond I, Tonnel AB. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*; 60: 1004-13.

⁹ Greene R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*: 43 (Suppl 1): S147-54.

apenas 40-65% dos casos provados por radiologia e serologia^{10,11}. Uma vez que o diagnóstico diferencial é amplo, incluindo tuberculose, micobacteriose atípica, sarcoidose, histoplasmose, coccidioidomicose, pneumoconiose, pulmão reumatóide, espondilite anquilosante e outras, a documentação da presença de *Aspergillus* spp. nas amostras respiratórias é importante para evitar o atraso no diagnóstico da aspergilose pulmonar e o tratamento incorrecto.

MycAssay™ Aspergillus é um kit de diagnóstico molecular para a detecção do DNA genómico de *Aspergillus* spp. com base na tecnologia de PCR com sinais moleculares (*Molecular Beacon*)¹². Todo o procedimento de análise, incluindo a extracção de DNA da amostra clínica, pode ser terminado em 4 horas, comparativamente à cultura fúngica que pode demorar vários dias a produzir resultados positivos. Este ensaio oferece vantagens sobre os métodos de diagnóstico actualmente disponíveis para a aspergilose invasiva aguda e a aspergilose pulmonar crónica. Estas vantagens incluem uma detecção mais rápida de *Aspergillus* spp. e o potencial de um aumento da sensibilidade a *Aspergillus* spp. em doentes altamente imunocomprometidos com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva.

Princípios do procedimento

A seguir à mistura dos reagentes no kit MycAssay™ Aspergillus com uma amostra contendo a sequência de DNA alvo de *Aspergillus* (uma porção do gene 18S ribossómico de *Aspergillus*), a termociclagem resulta na ocorrência da amplificação do DNA. O ensaio também contém um Controlo de Amplificação Interno (IAC), um fragmento de DNA não presente em genomas de *Aspergillus*, outros genomas fúngicos, bacterianos ou humanos, para detectar substâncias inibitórias da PCR e confirmar a funcionalidade dos reagentes do ensaio.

Os alvos de DNA amplificados são detectados com a tecnologia de sinais moleculares. Os sinais moleculares são amostras de hibridização de oligonucleótidos de cadeia única que formam uma estrutura de haste e ansa (*stem-and-loop*). A ansa contém uma sequência de amostras que é complementar à sequência alvo, e a haste é formada pela ligação de sequências de braço complementares que se encontram localizadas de ambos os lados da sequência de amostras. Um fluoróforo, que fluoresce quando excitado por luz com o comprimento de onda apropriado, é ligado covalentemente à extremidade de um braço e um supressor, que suprime a fluorescência do fluoróforo quando se encontra em grande proximidade física, é ligado covalentemente à extremidade do outro braço. Os sinais moleculares não entram em fluorescência quando se encontram livres na solução. No entanto, quando se hibridizam a uma cadeia de ácido nucleico que contém uma sequência alvo, são submetidos a uma alteração conformacional que separa o fluoróforo e o supressor fisicamente, possibilitando-lhes entrarem em fluorescência em consequência da excitação. A quantidade de fluorescência em qualquer ciclo, ou a seguir ao ciclo, depende da quantidade de produtos da amplificação presentes nessa altura. O sistema de PCR em Tempo Real SmartCycler monitoriza simultaneamente a fluorescência emitida por cada sinal.

Precauções

- O kit destina-se a ser utilizado apenas por profissionais de laboratório. Os procedimentos são necessários para manipulações não aerossol de amostras. As precauções normais e as directrizes institucionais devem ser seguidas no manuseamento de todas as amostras. A Myconostica Ltd. disponibiliza uma Ficha de dados de segurança do material.
- Este teste destina-se apenas a utilização diagnóstica *in vitro*.
- Este teste destina-se apenas a utilização em combinação com o software Roche LightCycler® 2.0 e o LightCycler® v4.1.
- Não utilize reagentes ou controlos se as bolsas protectoras estiverem abertas ou quebradas à chegada.
- Os reagentes e os controlos não são intercambiáveis entre kits com números de lote diferentes.
- Nunca junte reagentes ou controlos de tubos diferentes mesmo que pertençam ao mesmo lote.
- Nunca utilize reagentes ou controlos após o seu prazo de validade.
- Os reagentes e os controlos nunca devem voltar a ser congelados ou reutilizados após a abertura.
- Use roupas protectoras e luvas descartáveis enquanto manipular os kits de reagentes.
- Evite a contaminação microbiana e com desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes ao remover as alíquotas dos tubos.
- Recomenda-se a utilização de pontas de pipetas com filtro de baixa retenção descartáveis isentas de DNase ou pontas de pipetas de deslocamento positivo.
- Utilize uma nova ponta para cada amostra ou reagente.

¹⁰ Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. (2003). Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. *Clin Infect Dis*: 37 (Suppl 3): S265-80.

¹¹ Camuset J, Lavolé A, Wislez M, Khalil A, Bellocq A, Bazelly B, Mayaud C, Cadranel J. (2007). Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. *Rev Pneumol Clin*. 63:155-166.

¹² Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*: 14: 303-308.

- Elimine os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, federais, estaduais e locais.
- Para evitar a contaminação com produtos de amplificação de *Aspergillus* ou IAC, não abra os tubos de reacção após a amplificação.
- Podem ser analisados controlos adicionais de acordo com as directrizes ou os regulamentos de organização locais, estaduais, provinciais, federais ou acreditadas.
- Não coma, beba nem fume nas áreas em que as amostras e os reagentes dos kits são manuseados.
- Concentrações baixas de DNA podem ser instáveis se não forem conservadas correctamente. Recomenda-se que as extracções de DNA de amostras clínicas sejam conservadas a -80 °C para preservar a sua integridade. Múltiplos ciclos de descongelação e recongelação devem ser igualmente evitados sempre que possível.

Conteúdo do kit

Descrição

O kit consiste em cinco bolsas de folha seladas com 3 compartimentos, podendo ser cada uma delas removida da caixa e utilizada separadamente. Cada bolsa contém reagentes suficientes para 8 reacções.

| | | <u>Volume</u> |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tubo 1 (Tampa cor-de-laranja) | dNTPs MgCl ₂ Solução tamponada com complexo de DNA polimerase | 66 µL |
| Tubo 2 (Tampa verde) | <0,01% primários <0,01% sinais moleculares <0,0001% Controlo de Amplificação Interno (CAI) O Controlo de Amplificação Interno é um plasmídeo de DNA recombinante que abriga uma sequência não-infecciosa não relacionada com a sequência alvo (<i>Aspergillus</i>) Tampão Tris-HCl | 66 µL |
| Tubo 3 (Tampa transparente) | Controlo negativo Água | 25 µL |
| Tubo 4 (Tampa preta) | Controlo positivo <0,0001% DNA de controlo positivo A molécula do controlo positivo é um plasmídeo recombinante que abriga a sequência alvo <i>Aspergillus</i> Tampão Tris-HCl | 25 µL |

O kit contém igualmente:

- CD-ROM do Protocolo do MycAssay™ *Aspergillus* Myconostica
- Instruções de utilização
- Certificado de análise

Conservação

O kit deve ser conservado congelado (-15 a -25 °C) até ao prazo de validade indicado no rótulo da caixa do kit, momento em que deve ser eliminado em conformidade com as regulamentações locais.

Uma vez aberta uma bolsa, o conteúdo deve ser utilizado imediatamente, sem voltar a congelar nem reutilizar posteriormente.

Materiais/equipamentos necessários mas não fornecidos

- Sistema de PCR em Tempo Real Roche LightCycler® 2.0 (incluindo o manual do utilizador, o computador em anexo e o software LightCycler® versão v4.1)
- Centrífuga de carrossel LC 2.0 (opcionalmente, adaptadores capilares para minicentrífuga)
- Carrossel de amostras para tubos capilares de 20 µL
- Tubos capilares LC 2.0 de 20 µL com tampas
- Suporte para tubos capilares
- *Releaser* de capilares
- Ferramenta de capsular
- Microcentrífuga
- Agitador vórtice
- Micropipetas (volumes necessários 7,5 µL – 20 µL)
- Pontas de filtro de baixa retenção estéreis
- Luvas descartáveis, sem pó
- Solução de descontaminação de DNA patenteada
- Kit de isolamento de DNA (ver em baixo)
- Kit MycAssay™ CC (ver abaixo)

Amostra

A amostra para o ensaio MycAssay™ Aspergillus é DNA genómico total extraído de amostras clínicas de LBA e de outras amostras das vias respiratórias inferiores. Para este efeito recomenda-se o seguinte kit de isolamento e equipamento, que foi utilizado durante a validação:

- Kit de Extração de DNA Fúngico MycXtra™ (REF: 080-005 disponibilizado pela Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Placa de adaptação para vórtice (REF: 080-015 disponibilizado pela Myconostica)

Kit de Compensação da Cor MycAssay™ (CC)

Uma análise precisa de dados obtidos através do ensaio MycAssay™ Aspergillus requer a aplicação de um ficheiro de compensação da cor criado com o kit MycAssay™ CC [REF 080-080]. Uma vez criado, o ficheiro pode ser utilizado para multiplicar execuções na mesma máquina. Por favor, contacte o seu distribuidor local para obter mais informação.

Observações metodológicas

- Leia todo o protocolo antes de começar.
- O processo completo do MycAssay™ Aspergillus (excluindo a extração de DNA) demora aproximadamente 2 horas, dependendo do número de amostras analisadas.
- A preparação da análise deve ser efectuada numa estação de trabalho de PCR ou num laboratório pré-PCR. Se não houver uma estação de trabalho de PCR disponível, a análise deve ser preparada numa área específica do laboratório¹³, separada de áreas utilizadas para extração de DNA, que seja regularmente limpa com reagentes de descontaminação de DNA.
- No entanto, evite utilizar reagentes de descontaminação de DNA durante a preparação da PCR em tempo real uma vez que podem interferir com o ensaio.
- Utilize micropipetas para transferência de fluidos. Para a preparação destas reacções devem ser utilizadas micropipetas específicas que devem ser regularmente descontaminadas.
- Recomenda-se a utilização de pontas de filtro de baixa retenção para assegurar que nenhum DNA é perdido durante a preparação do procedimento.
- Proceda com precaução ao manipular o Tubo 4. Este contém material de controlo positivo de DNA, e uma contaminação pode dar origem a resultados de análise positivos falsos.
- Use sempre luvas.
- Todos os tubos de reagente devem ser tapados a seguir à utilização e antes da sua eliminação.
- Aponte com precisão, no plano experimental, as posições de todos os tubos capilares que contêm amostras relevantes na posição 32 do carrossel.
- Uma análise precisa dos dados exige a aplicação de um ficheiro de compensação da cor criado com o kit Myconostica MycAssay™ CC.

¹³ Vide por exemplo Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *em* PCR Primer, 2ª Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. EUA.

Procedimento para a utilização

1. Preparação da PCR em tempo real

- 1.1 Para começar, ligue o sistema de PCR em Tempo Real LightCycler® 2.0 (equipamento, computador associado e centrifugadora) e inicie o software relevante. Introduza o nome de utilizador e a palavra-passe e escolha a base de dados de diagnóstico. Se for a primeira execução do dia, execute um auto-teste no equipamento antes de iniciar a execução.
- 1.2 **Tome nota:** Deve ser realizada uma execução de compensação da cor antes de se analisar os resultados para o MycAssay™ Aspergillus no LightCycler® 2.0. No entanto, isto não precisa de ser realizado antes de se utilizar este produto, podendo ser realizado e aplicado posteriormente a este ficheiro de execução.
- 1.3 Assegure-se de que a área de trabalho foi limpa com reagentes de descontaminação de DNA e deixe secar completamente; evite utilizá-los durante a preparação do ensaio uma vez que o excesso de solução de limpeza pode inibir as reacções de PCR.
- 1.4 Cada bolsa contém um tubo de cada Tubo 1, Tubo 2, Tubo 3 e Tubo 4. Em cada bolsa existem reagentes suficientes para executar 8 reacções. Devem ser realizadas, pelo menos, uma reacção com controlo positivo e uma reacção com controlo negativo por execução em que os reagentes são de um único kit. Por conseguinte, uma bolsa pode analisar 6 amostras de doentes. Se for necessário analisar mais de 6 amostras, pode utilizar-se mais de uma bolsa se as bolsas utilizadas forem do mesmo lote. Todavia, o LightCycler® 2.0 só pode analisar até 32 numa única execução. Por isso, podem realizar-se até 30 amostras de doentes numa única execução (4 bolsas).
- 1.5 Calcule o número de reacções necessárias consultando a tabela abaixo:

| Número de bolsas | Número máximo de amostras de doente |
|------------------|-------------------------------------|
| 1 | 6 |
| 2 | 14 |
| 3 | 22 |
| 4 | 30 |

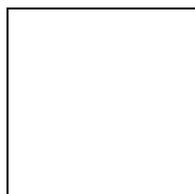
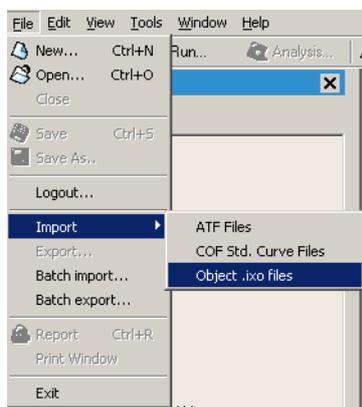
- 1.6 Retire o número adequado de bolsas do congelador. Não utilize bolsas que já não estejam seladas. Se as amostras de doentes tiverem sido congeladas após a extracção, remova-as igualmente do congelador.
- 1.7 Abra o número necessário de bolsas e retire os tubos. Se for utilizada mais de uma bolsa, mas se for executado apenas um conjunto de controlos positivos e negativos, só é necessário retirar os Tubos 3 e 4 de uma das bolsas. **Proceda com precaução ao manipular o Tubo 4. Este contém material de controlo positivo de DNA, e uma contaminação pode dar origem a resultados de doente positivos falsos.**
- 1.8 Deixe o conteúdo dos tubos descongelar colocando-os sobre a bancada do laboratório durante 5-10 minutos, assegurando-se que o conteúdo de cada tubo descongela antes de prosseguir. Agite o conteúdo dos tubos e as amostras de doentes no vórtice; prossiga com uma breve centrifugação numa microcentrífuga para garantir a acumulação de todo o conteúdo no fundo dos tubos antes de utilizar.
- 1.9 Coloque o número exigido de capilares de 20 µL num suporte para tubos capilares. Tome cuidado para não deixar marcas no vidro.
- 1.10 Prepare sempre primeiro o controlo negativo, seguido pelas amostras do doente. O controlo positivo deve ser sempre preparado em último lugar.
- 1.11 Os volumes de reagente e de DNA são apresentados na seguinte tabela:

| Reagente | Reacção | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Controlo negativo | Amostras do doente | Controlo positivo |
| Tubo 1 (tampa cor-de-laranja) | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| Tubo 2 (tampa verde) | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| Tubo 3 (tampa transparente) | 10 µL | - | - |
| Amostras de doente | - | 10 µL | - |
| Tubo 4 (tampa preta) | - | - | 10 µL |
| Volume total | 25 µL | 25 µL | 25 µL |

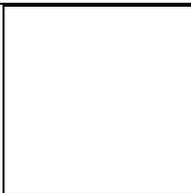
- 1.12 Adicione os reagentes na ordem apresentada na tabela anterior; o Tubo 1, em seguida o Tubo 2, seguido pelo padrão (controlo negativo, amostra do doente ou controlo positivo). Tome cuidado ao retirar alíquotas do Tubo 1; o líquido é ligeiramente viscoso e pode aderir à aresta interna do tubo. Se isto acontecer, volte a centrifugar para acumular o conteúdo final na base do tubo antes de tentar remover as alíquotas finais.
- 1.13 Utilize uma nova ponta de pipeta para cada transferência de líquido. Volte a tapar cada tubo de reagente a seguir à utilização e elimine-o imediatamente, assim como todo o conteúdo restante, num recipiente de resíduos clínicos que possa ser selado. Os reagentes não utilizados não podem ser guardados para utilização posterior.
- 1.14 Tenha um cuidado adicional ao pipetar o Tubo 4 (controlo positivo de DNA) para assegurar que não contamina outra reacção. Fechando todos os outros capilares antes de abrir o Tubo 4 pode reduzir o risco de contaminação cruzada.
- 1.15 Feche os tubos capilares cuidadosamente com as tampas fornecidas na caixa dos capilares, utilizando uma ferramenta de capsular. Assegure-se que os tubos capilares estão firmemente fechados. Os tubos capilares podem ser fechados depois de se adicionar o padrão à reacção, quando se pretende reduzir o potencial de contaminação cruzada e/ou do ambiente.
- 1.16 Quando não está disponível uma centrífuga de carrossel, centrifugue as amostras numa minicentrífuga, utilizando os adaptadores fornecidos juntamente com a prateleira de suporte. Caso contrário, continue com 1.17.
- 1.17 Transfira todos os tubos capilares com cuidado para o carrossel, exactamente pela mesma ordem em que estão metidos no suporte, começando com o primeiro tubo capilar na posição 1 e continuando numa ordem ascendente, sem deixar quaisquer lacunas. Empurre cada tubo capilar completamente para baixo até assentar no seu sítio.
- 1.18 Se não tiverem sido ainda centrifugadas até ao item 1.16, centrifugue as amostras com a centrífuga de carrossel LC 2.0.
- 1.19 Avance imediatamente para a Secção 2. As reacções do MycAssay™ Aspergillus permanecem estáveis na bancada durante até 60 minutos.
- 1.20 A seguir à preparação do PCR, certifique-se de que a área de trabalho volta a ser perfeitamente limpa utilizando reagentes de descontaminação de DNA.

2. Realizar a execução

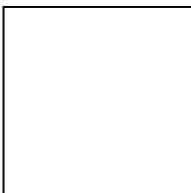
- 2.1 Insira o **CD-ROM do Protocolo do MycAssay Aspergillus Myconostica**.
- 2.2 Vá para **Import** (Importar), através do directório **File** (Ficheiro), e seleccione **Object .ixo files**. Importe o ficheiro **Macro MAA v1.2.ix** do CD para a sua base de dados.



- 2.3 Vá para **Save** (Guardar), através do directório **File** (Ficheiro), e guarde o macro-padrão no lugar pretendido da sua base de dados.

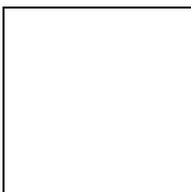
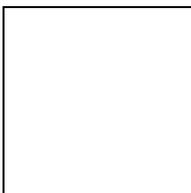


2.4 Seleccione a opção **Run Macro** (Executar macro) na barra de ferramentas.



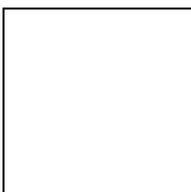
2.5 Seleccione o ficheiro do padrão **Macro MAA v1.2** e prima **Open** (Abrir).

2.6 Siga as instruções dadas pelo assistente de instalação. Marque a caixa **Perform Self-Test**, quando se trata da primeira execução do dia.



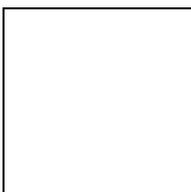
2.7 Atribua um nome ao ficheiro da execução e guarde-o no lugar pretendido.

2.8 Vá para a secção Amostras e clique no separador no lado esquerdo do ecrã. Introduza os números de amostra na caixa **Samples Count** e os nomes no separador **Capillary view**. Utilize os mesmos nomes utilizados para as amostras no plano experimental e conforme posicionados no carrossel.



2.9 Coloque o carrossel centrífugo no equipamento LC 2.0. Assegure-se que o ressalto debaixo da posição de amostra 1 no carrossel engata na posição com o pino na câmara térmica. Assegure-se que o carrossel está firmemente inserido na câmara e feche a tampa.

2.10 Depois de concluído, prima o botão **Start** (Iniciar). Assegure-se que o equipamento encontrou todos os capilares inseridos no carrossel e que o programa iniciou.

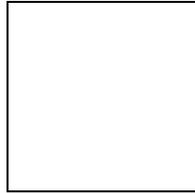


3. Análise e interpretação de dados

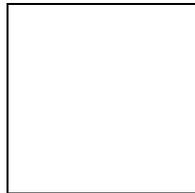
3.2 **Tome nota:** Um objecto para compensação da cor deve ser aplicado antes de se analisar os resultados para o MycAssay™ Aspergillus no LightCycler® 2.0. Se não for o caso, aplique um objecto antes de continuar com a análise e interpretação dos dados.

Uma vez terminada a execução, verifique os conteúdos do relatório exibido e imprima-o, caso necessário.

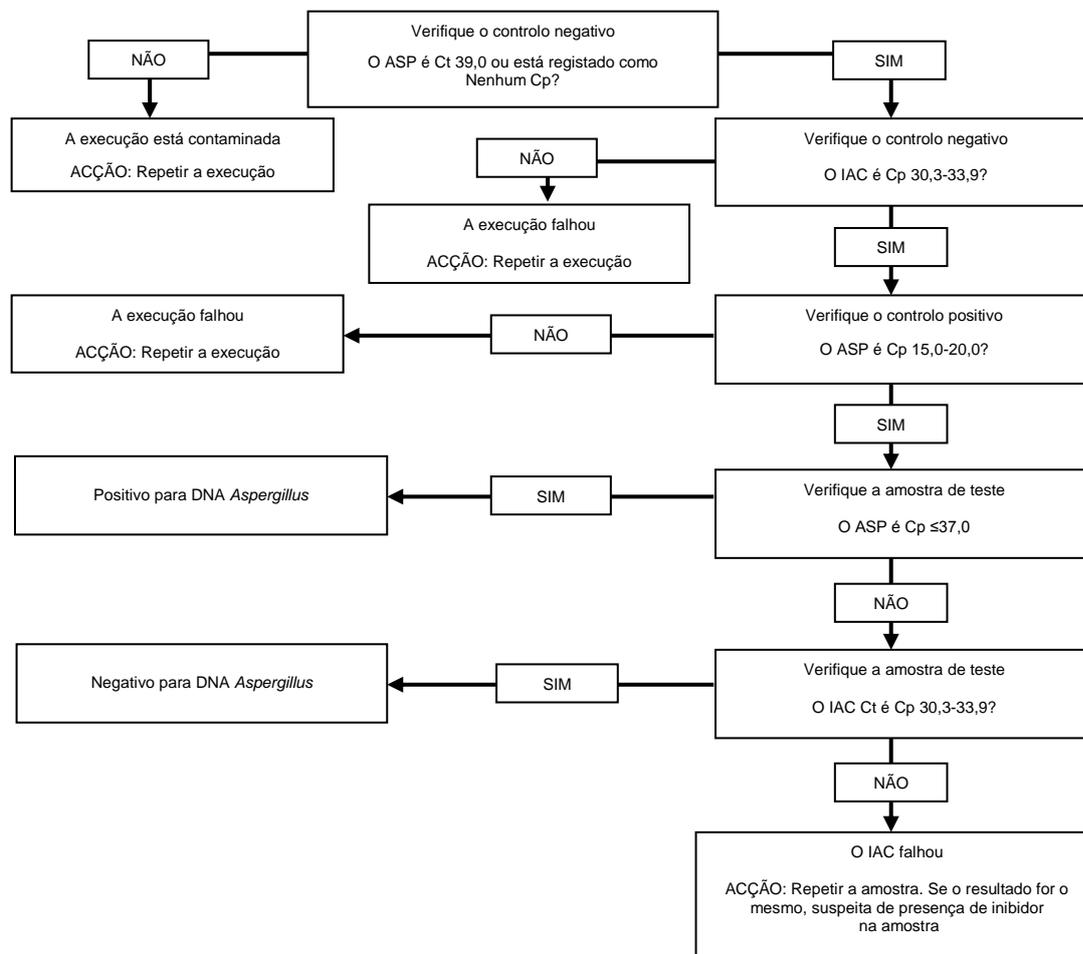
3.3 Os resultados de Aspergillus podem ser vistos na secção de análise **Pathogen (530)**, e os resultados IAC na secção de análise **IAC (560)**.



3.4 Nas duas secções **ASP (530)** e **IAC (560)**, seleccione o ficheiro de Compensação da Cor correcto (**MycAssay CC file**) a ser aplicado à experiência.



3.5 Analise cada amostra, começando com os controlos, conforme mostrado no fluxograma abaixo (também podem ser encontrados detalhes na tabela apresentada abaixo do fluxograma).



| Amostra | Pathogen (530) Cp | IAC (560) Cp | Interpretação | Medida subsequente |
|-------------------|--------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Controlo negativo | 39,0 ou nenhum Cp | Entre 30,3 e 33,9 | Controlo negativo aceitável | Os resultados do doente são válidos |
| Controlo negativo | 39,0 ou nenhum Cp | <30,3 ou >33,9 | Falha no controlo negativo | Repetir a execução completa |
| Controlo negativo | <39,0 | Entre 30,3 e 33,9 | Contaminação | Repetir a execução completa |
| Controlo positivo | Entre 15,0 e 20,0 | N/D | Controlo positivo aceitável | Os resultados do doente são válidos |
| Controlo positivo | <15,0 ou >20,0 | N/D | Falha no controlo positivo | Repetir a execução completa |
| Amostra do doente | ≥39,0 ou nenhum Cp | Entre 30,3 e 33,9 | Negativo para <i>Aspergillus</i> | Registar resultado: Resultado 1 |
| Amostra do doente | ≤37,0 | N/D | Positivo para <i>Aspergillus</i> | Registar resultado: Resultado 2 |
| Amostra do doente | ≥39,0 ou nenhum Cp | <30,3 ou >33,9 | Falha do IAC na amostra | Repetir a amostra: Resultado 3 |

*CCO = *cut-off* clínico. Todos os resultados ao nível ou abaixo do nível são considerados clinicamente positivos. Outras amostras podem registar valores de Cp >37,0, mas estas são reflectores de níveis normais ou de fundo da carga de *Aspergillus* na amostra respiratória.

Ver Relatório Clínico (Resultado 1, 2 ou 3)

4. Resolução de problemas

4.1 O controlo negativo gerou um sinal positivo no canal 530:

- Ocorreu contaminação durante a preparação. Os resultados de toda a execução não são fiáveis como sendo precisos.
- Repita toda a execução, tendo muito cuidado ao adicionar os padrões, em particular o controlo positivo (Tubo 4), para assegurar que não ocorre contaminação cruzada.
- Certifique-se de que a área de trabalho e os instrumentos estão adequadamente descontaminados antes e depois de utilizar.
- O controlo negativo foi posicionado incorrectamente no equipamento.
- Assegure-se que os capilares são correctamente apontados no software.

4.2 O valor Cp de IAC do controlo negativo não se situa dentro do intervalo aceitável:

- A PCR foi inibida.
- Certifique-se de que a área de trabalho e os instrumentos estão perfeitamente secos após a utilização de agentes de descontaminação, antes da preparação da PCR.
- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.
- Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.
- O reagente do Tubo 1 ou 2 não foi adicionado à reacção da PCR ou foi adicionada a quantidade a dobrar do Tubo 2.
- Repita a execução tendo cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observarem-se níveis mais altos ou mais baixos de líquido num capilar de reacção, comparados com os outros.
- Não foi aplicado o ficheiro CC correcto aos dados.
- Crie um ficheiro CC com o kit Myconostica MycAssay CC, aplique-o aos resultados e proceda a uma nova análise. Contacte o seu distribuidor local para obter mais informações sobre este kit.

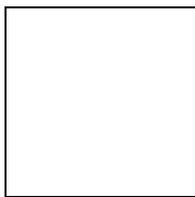
4.3 O controlo positivo está negativo:

- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.
- Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.
- Ocorreu um erro durante o passo 1.11/1.13 e o padrão do controlo positivo (Tubo 4) foi colocado no tubo de reacção errado.
- Repita a execução tendo muito cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observar um nível mais alto de líquido num tubo de reacção e um nível mais baixo noutra, comparativamente ao normal.
- O reagente do Tubo 1 ou 2 não foi adicionado à reacção.
- Repita a execução tendo cuidado na fase de preparação. Estes erros podem ser detectados ao observarem-se níveis mais baixos de líquido neste capilar de reacção, comparados com os outros.
- O controlo positivo foi posicionado incorrectamente no equipamento.
- Assegure-se que os capilares são correctamente apontados no software.

4.4 A(s) amostra(s) de doente é (são) negativa(s) e o IAC está fora do intervalo (Resultado 3):

- É provável que a(s) amostra(s) de doente contenha(m) inibidores da PCR.
- Recomenda-se que o DNA das amostras seja extraído utilizando o kit de Extração de DNA Fúngico MycXtra™.

4.5 A amostra do doente é negativa na secção ASP (530), e o gráfico IAC (560) desvia-se significativamente da base regular (conforme mostrado na imagem exemplar abaixo; as setas indicam gráficos anormais):



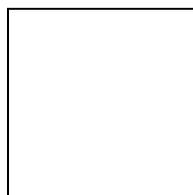
- A reacção PCR foi inibida.
- Certifique-se de que a área de trabalho e os instrumentos estão perfeitamente secos após a utilização de agentes de descontaminação, antes da preparação da PCR.
- Execute novamente a amostra do doente. Se o problema persistir, o inibidor PCR está presente na amostra. Registe a amostra como Indeterminada.

4.6 O resultado na secção IAC (560) corresponde quase exactamente ao resultado na secção Pathogen (530).

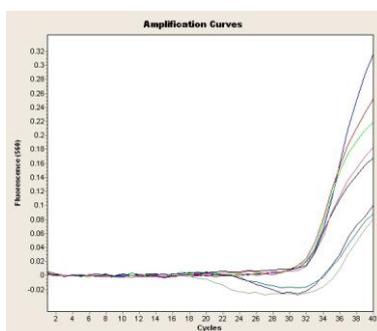
- Não foi aplicado um ficheiro de Compensação da Cor, ou foi aplicado um ficheiro errado, aos resultados da experiência.
- Verifique nas duas secções se a compensação da cor está em “ON” e que foi aplicado o mesmo ficheiro MycAssay CC nos dois canais.

4.7 A base para algumas amostras corresponde ao controlo negativo, indicando que não ocorreu nenhuma amplificação. Todavia, o software apresentou um valor Cp positivo (conforme mostrado na figura abaixo):

- Uma saída de Cp positivo para um gráfico de amplificação negativa só foi observada duas vezes em 154 reacções negativas, realizadas durante estudos de validação.
- Quando isso acontece, repita a(s) amostra(s) para confirmar um resultado *Negativo*.



4.8 Quando aplico o meu objecto CC, alguns dados nos ressaltos de canal 560 IAC resultaram em valores Cp que ficam fora do intervalo aceitável:



- Este resultado é totalmente normal para reacções que contenham elevadas concentrações de DNA alvo, pelo que não interferem com a interpretação dos resultados do doente.
- Siga a análise normal; pode ver que, para amostras com resultado positivo para *Aspergillus*, o resultado IAC não precisa de ser tomado em consideração numa decisão relativa ao resultado para o doente.

4.9 Não existem resultados para qualquer canal com amostras ou controlos:

- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.
- Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.
- O equipamento utilizado não funciona correctamente.
- Verifique se o seu equipamento de PCR em tempo real tem o histórico de manutenções actualizado e se foi totalmente calibrado conforme descrito no Guia de Instalação e Manutenção.
- Foi utilizado um ficheiro de protocolo incorrecto durante a configuração do software.
- Consulte a Secção 2 e seleccione o ficheiro de protocolo correcto, conforme especificado para cada tipo/versão de software, do CD-ROM do Protocolo Myconostica. Só pode ser carregado o ficheiro apropriado para o software. Repita a execução utilizando o ficheiro de protocolo correcto.

Se tiver mais dúvidas ou problemas ou se tiver problemas, contacte o Apoio Técnico (productsupport@lab21.com)

Características e limitações do desempenho

O kit foi inicialmente validado utilizando o Cepheid SmartCycler®. Determinadas reivindicações de desempenho do ensaio foram revalidadas na plataforma LightCycler® 2.0, utilizando capilares de vidro de 20 µL (Roche Cat # 04929292001 ou 11909339001), e são apresentadas abaixo. Onde não se esperava que as diferenças entre plataformas afectassem o desempenho do ensaio, e, por isso, a reivindicação, o estudo não foi repetido. Estes resultados, obtidos utilizando o SmartCycler®, são considerados transferíveis para a plataforma LightCycler® 2.0.

Sensibilidade analítica

Com o protocolo do LightCycler® 2.0 descrito anteriormente, e os padrões da PCR gerados na Myconostica, o LoB do MycAssay™ Aspergillus foi determinado como sendo um Cp de 39,0, enquanto o LoD foi determinado como sendo <25 cópias de DNA alvo, utilizando a estirpe AF293 de *A. fumigatus*.

Selectividade analítica

O DNA genómico extraído a partir de *Penicillium* spp. gera resultados positivos. Tal deve-se ao facto das sequências dos alvos moleculares serem grandemente conservadas entre *Aspergillus* e *Penicillium*. Por conseguinte, deve notar-se que um resultado positivo neste ensaio pode ser o resultado de infecção por *Penicillium* e não por *Aspergillus*.

A selectividade analítica foi testada com DNA extraído de uma variedade de espécies fúngicas e não-fúngicas diferentes. As espécies seguintes não apresentaram um resultado positivo:

Blastomyces capitatus, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cladosporium* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Doratomyces microsporus*, *Fusarium solani*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhodotonia rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon capitatum*. As espécies bacterianas seguintes não apresentaram um resultado 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*.

O DNA humano e as 3 espécies seguintes, *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* e *Alternaria alternata*, não foram testadas no sistema LightCycler® 2.0, mas sim no SmartCycler®. Todos os 4 testes apresentaram resultados negativos com o ensaio.

Reprodutibilidade e repetibilidade

A repetibilidade e a reprodutibilidade foram determinadas por 4 operadores diferentes que analisaram um painel de 7 padrões diferentes, em triplicado, num total de 168 ensaios. As experiências foram realizadas utilizando 1 lote de fabricação diferente do kit MycAssay™ Aspergillus, em 2 equipamentos diferentes situados em 2 locais diferentes no Reino Unido.

Os resultados foram analisados contra o limite do branco (LoB) e o *cut-off* clínico (CCO). Com uma concentração de 6 vezes o limite de detecção (LoD), os resultados de 100% de todas as amostras analisadas estavam em concordância (positivo) com o LoB e 87,5% das amostras estavam em concordância no CCO. Com concentrações superiores a 6 x LoD, os resultados de 100% de todas as amostras estavam em concordância tanto com CCO como LoB.

Transferência do *cut-off* clínico

O *cut-off* clínico de 36,0 foi estabelecido no SmartCycler®. Este *cut-off* foi transferido analiticamente para a plataforma do LightCycler® 2.0, utilizando um padrão com uma concentração de *Aspergillus* que tinha demonstrado render $\geq 95\%$ de resultados positivos no CCO do SmartCycler®. Foi determinado um valor de Cp de 37,0, que foi então confirmado utilizando padrões com 3 concentrações diferentes.

As seguintes Reivindicações de Desempenho foram estabelecidas utilizando o Cepheid SmartCycler®

Substâncias interferentes (contra-indicações para a utilização)

Os compostos seguintes foram analisados com concentrações clinicamente relevantes e considerados como não inibindo o ensaio: acetilcisteína, anfotericina, dipropionato de beclometasona, budesonida, colistimetato de sódio, propionato de fluticasona, fumarato de formoterol di-hidratado, brometo de ipratrópio, lidocaína, manitol, sulfato de salbutamol, salmeterol, cloreto de sódio, cromoglicato de sódio, terbutalina, tobramicina.

Avaliação do desempenho

Para avaliar o desempenho do kit MycAssay™ Aspergillus em amostras clínicas foram utilizadas amostras respiratórias (BAL), colhidas em 2 hospitais, extraídas com o kit MycXtra® e conservadas. Foram feitas comparações tanto com o diagnóstico clínico como com a cultura.

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 diferenciação 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 | | |

PCR vs Cultura de Aspergillus

| | Cultura positiva | Cultura negativa | | |
|--------------|------------------|------------------|------|-----|
| PCR positiva | 29 | 3 | 0.91 | PPV |
| PCR negativa | 2 | 10 | 0.83 | NPV |
| | 0.94 | 0.77 | | |
| | Sensibilidade | Especificidade | | |

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

Relatório clínico

O kit MycAssay™ Aspergillus foi concebido como uma ajuda no diagnóstico. Os resultados têm de ser contextualizados na doença clínica do doente e noutros resultados de análises de diagnóstico.

Os seguintes são relatórios recomendados, dependendo cada um da interpretação do resultado do ensaio:

Resultado n.º 1

“*Aspergillus* spp. não detectado.”

Resultado n.º 2

“*Aspergillus* spp. detectado. Resultado positivo. Este ensaio também detecta *Penicillium* spp.”

Resultado n.º 3

“Análise falhada; presença de inibidores ou de outra substância desconhecida.”

Limites do procedimento

- O limite principal deste procedimento relaciona-se com a qualidade da amostra principal:
 - Se a amostra for muito pequena ou se não tiver sido colhida na área afectada do pulmão, a análise será menos sensível e pode ser falsamente negativa.
 - As amostras da BAL devem ser centrifugadas antes da extracção do DNA do sedimento.
 - Os dados demonstraram igualmente que a redução no volume do sobrenadante utilizado no processo de extracção, alcançada pelo passo de centrifugação, diminui a proporção de inibidores que entram no sistema.

- Resultados positivos falsos são possíveis se o agente infectante for *Penicillium* spp., que não pode ser diferenciado de *Aspergillus* spp. mediante a utilização deste kit.
- Embora o procedimento de extração de DNA fúngico MycXtra™ tenha sido concebido para remover os inibidores da PCR, nem todos os fármacos ou populações de doentes foram avaliados.
- O procedimento não foi totalmente avaliado em esputo nem em amostras induzidas com solução salina ou amostras provenientes de crianças.
- Podem ser obtidos resultados positivos falsos provenientes da contaminação externa da amostra ou da análise original. Essa contaminação pode surgir do ar contaminado com *Aspergillus*, uma técnica experimental fraca no que se refere ao controlo positivo ou contaminação externa (especialmente pipetador) com DNA de *Aspergillus*.
- Uma vez que um resultado positivo verdadeiro pode ser obtido de doentes que estejam transitoriamente ou persistentemente colonizados com *Aspergillus* spp., é necessária a avaliação clínica na interpretação dos resultados da análise, no contexto da doença.

AUTORIZAÇÃO

TopTaq™ Hot Start é fornecido por QIAGEN. QIAGEN® é uma marca comercial registada da Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha.

Este produto é comercializado sob a licença do *Public Health Research Institute*, Newark, New Jersey, EUA e pode ser utilizado sob os direitos de patente do PHRI apenas para o diagnóstico humano *in vitro*.

SmartCycler® é uma marca comercial registada da Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, EUA.

Parte deste produto está coberta por uma licença exclusiva a um pedido de patente detido pelo Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, EUA.

LightCycler® é uma marca comercial da Roche Diagnostics, GmbH.



Lab21, 184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA, United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882
Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

IVD

