



## ASPERGILLUS SPECIES PCR MET RESISTENTIEBEPALING (ASPERGENIUS)

---

### INHOUD

- **Indicaties**
- Kostprijs en terugbetalingsmodaliteiten.
- **Uitvoerfrequentie.**
- Kwaliteitscontrole
- Beproevingsmethode
- **Interpretatie resultaat**
- Referenties

---

### INDICATIES

Naast de detectie van *Aspergillus species* gebeurt er ook een bijkomende specifieke typering van *Aspergillus fumigatus* en *Aspergillus terreus*. Daarnaast worden ook de twee meest voorkomende triazole resistentie mechanismen in het cyp51A gen van *A. fumigatus* opgespoord, namelijk TR34/L98H en TR46/Y121F/T289A.

Deze PCR test kan aangevraagd worden op broncho-alveolaire vochten, normaal steriele vochten (met uitzondering van bloed) en biopten. Het is belangrijk om naast de Aspergillus PCR test ook steeds een fungale kweek aan te vragen aangezien door middel van kweek ook andere fungi kunnen opgespoord worden en in geval van groei een fenotypische gevoeligheidsbepaling kan uitgevoerd worden.

Indicaties voor aanvraag van deze Aspergillus PCR test zijn:

- Vermoeden van een schimmelinfectie bij een patiënt met een risico op schimmelinfecties waarbij een normaal steriel staal (biopt of punctievocht) wordt afgenomen
- Aanwezigheid van schimmeldraden in het rechtstreeks microscopisch onderzoek van een normaal steriel staal
- Patiënt met waarschijnlijke invasieve pulmonaire aspergillose waarbij de galactomannan bepaling in het BAL vocht positief is en de cultuur negatief (een bij-aanvraag op het BAL vocht is in die context mogelijk en biedt het voordeel dat eventuele resistentie kan worden gedetecteerd worden ondanks de negatieve kweek).

### KOSTPRIJS EN TERUGBETALINGSMODALITEITEN

Zie labogids:

items 'RIZIV Nomenclatuurnummer' en 'Extra - per formulier en aanvraag' (diagnoseregels/prijs)

### UITVOERINGSFREQUENTIE

Zie labogids:

## KWALITEITSCONTROLE

- **Staalsoort onder accreditatie:** BAL, diverse vochten, biopsie

Bij elke run wordt een negatieve extractiecontrole en een positieve kitcontrole mee geanalyseerd. Minstens één maal per maand wordt ook een eigen positieve eerstelijnscontrole geanalyseerd. Indien de waarden voor deze controle stalen binnen vooraf vastgestelde acceptatielimiëten liggen worden de staalresultaten van de run aanvaard.

Voor elk staal wordt de kwaliteit van het nucleïnezuurextract gecontroleerd via een kwantitatieve PCR van een heterogene interne controle (IC) toegevoegd voorafgaand aan de nucleïnezuurextractie. Het resultaat van deze IC controleert de kwaliteit van het nucleïnezuurextract en de afwezigheid van inhibitoren.

## BEPROEVINGSMETHODE

DNA-extractie van het staal gevolgd door real-time PCR en smeltcurves

- **BAL, diverse vochten en biopsie:** DNA-extractie via NucliSens easyMAG/eMAG (BioMérieux) (semi-geautomatiseerde methode)

Voorbehandeling en lysis van het staal in een GUSCN-buffer gevolgd door binding van het vrijgestelde nucleïnezuur aan silica gecoate magnetische beads. De beads worden vervolgens gewassen via 2 wasbuffers om onzuiverheden te verwijderen en in een laatste stap wordt het nucleïnezuur van de beads geëluëerd in elutiebuffer.

In één extractierun kunnen 1-24 stalen geëxtraheerd worden in een tijdsduur van 2.5 tot 3.5 uur.

- **AsperGenius (Pathonostics) analyse via LightCycler 480II (Roche)**

De AsperGenius Resistance Multiplex kit (Pathonostics) detecteert alle klinisch relevante Aspergillus species en specifiek *A. fumigatus* en *A. terreus* via real-time PCR met fluorescente probe. Bij een *A. fumigatus* positief resultaat is er ook de detectie van de meest voorkomende azole resistentiemechanismen TR34/L98H en TR46/Y121F/T289A. De bepaling van deze resistentiemechanismen verloopt via real-time PCR gevolgd door bepaling van 'single nucleotide polymorphisms (SNP's)' via fluorescente probes en smeltcurves.

Indien het *A. fumigatus* positieve signaal te zwak is, is de bepaling van de resistentiemechanismen mogelijk onvolledig of negatief waardoor geen uitsluitel kan gegeven worden over de aan-of afwezigheid van deze resistentiemechanismen

In één run kunnen 1-48 analyses uitgevoerd worden in een tijdsduur van 3 tot 5 uur.

## INTERPRETATIE RESULTAAT

De test geeft kwalitatieve resultaten die door de medisch supervisor vertaald wordt in een rapport-conclusie

- **Negatief:** geen Aspergillus DNA gedetecteerd
- **Positief voor Aspergillus fumigatus. Geen resistentiemechanisme (TR34/L98H of TR46/Y121F/T289A) gedetecteerd.**
- **Positief voor Aspergillus fumigatus met TR34/L98H resistentiemechanisme. Deze mutatie leidt tot resistentie tegen triazolen.**
- **Positief voor Aspergillus fumigatus met TR46/Y121F/T289A resistentiemechanisme. Deze mutatie leidt tot resistentie tegen triazolen.**
- **Positief voor Aspergillus fumigatus maar te zwak voor de detectie van resistentiemechanismen.**
- **Positief voor Aspergillus species. Verschillend van Aspergillus fumigatus.**
- **Positief voor Aspergillus terreus.**
- **Positief voor Aspergillus lentulus.**



- **Positief voor Aspergillus felis.**
- Bij inhibitie (verzwakt of negatief IC resultaat bij een Aspergillus negatief staal): **'Onbeslist door inhibitie van de reactie, indien opportuun graag nieuw staal'**.

#### REFERENTIES

- "Validation of a New Aspergillus Real-Time PCR Assay for Direct Detection of Aspergillus and Azole Resistance of Aspergillus fumigatus on Bronchoalveolar Lavage Fluid"; G.M. Chong et al.; JCM (March 2015), Vol. 53 No. 3, p.868-874.
- "PCR-based detection of Aspergillus fumigatus Cyp51A mutations on bronchoalveolar lavage: a multicenter validation of the AsperGenius assay in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis"; G.M. Chong et al.; J. Antimicrob. Chemother (2016), Vol. 71, p.3528-3535.
- "Culture-Based Methods and Molecular Tools for Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Detection in a Belgian University Hospital; Montesinos I. et al.; JCM (August 2017), Vol. 55 No. 8, p.2391-2399.