

MycAssay™ Pneumocystis

Applied BioSystems 7500

Respiratoriska Prover

REF 080-035

Avsedd användning

MycAssay™ Pneumocystis är avsett att användas av kvalificerad laboratoriepersonal till kvalitativ bestämning av genomiskt DNA från *Pneumocystis jirovecii* efter extrahering från prover tagna från de nedre luftvägarna (t.ex. bronkialprover) som hjälp vid diagnosticering av vuxna patienter med misstänkt infektion eller allergi orsakad av *Pneumocystis jirovecii*.

MycAssay™ Pneumocystis har utvärderats för användning tillsammans med Applied BioSystems 7500 (med SDS-programversion 1.4).

Sammanfattning och förklaring

Pneumoni från *Pneumocystis jirovecii* (tidigare *carinii*) (PCP) är en vanlig opportunistisk pneumoni hos patienter med nedsatt immunförsvar, särskilt vid avancerade HIV-infektioner och AIDS¹. Den är typiskt samhällsförvärd och subakut, samt leder till fortskridande andningssvikt och död² om den inte behandlas. Profylax med trimetoprim-sulfametoxazol (Bactrim eller Septrin) ges rutinemässigt till många riskpatienter, en metod som avsevärt minskat incidensen av PCP, men genombrott inträffar, och de som inte vet att de är HIV-positiva kan ha AIDS med PCP³. PCP förekommer även hos andra patienter med nedsatt immunförsvar, som vid transplantation av fasta organ, hypogammaglobulinemi och kronisk leukemi.

För närvarande förlitar sig diagnosticering av PCP på mikroskopiska metoder, eftersom *P. jirovecii* inte kan odlas i mikrobiologiska rutinlaboratorier. Bronkiallavage (BAL) är den metod som föredras för erhållande av prover. Vanliga diagnosmetoder är immunfluorescens (IF) eller direkt fluorescens och histologisk färgning av prover⁴.

MycAssay™ Pneumocystis är ett kit för molekylär diagnosticering för upptäckt av *P. jirovecii* baserat på Molecular Beacon⁵-PCR-metodik. Hela testproceduren, inbegripet extrahering av DNA från det kliniska provet, kan genomföras inom 4 timmar, eller endast 2 timmar om extraherat DNA redan finns tillgängligt. Den här analysen ger den direkta fördelen av ökad laboratorieeffektivitet och ett snabbt test som bör leda till kliniska fördelar. Testets diagnostiska noggrannhet beror till stor del av provets kvalitet.

Procedurens principer

När reagensen i MycAssay™ Pneumocystis-kitet blandats med ett prov som innehåller mål-DNA-sekvensen för *Pneumocystis* (ett avsnitt av den ribosomala stora underenheten för *Pneumocystis*-mitokondrier), resulterar termocyklning i DNA-amplifiering. Analysen innehåller också en Internal Amplification Control (IAC), ett DNA-fragment som inte finns i *Pneumocystis*, andra svamp-, bakterie- eller humana genom, för att upptäcka PCR-hämmande ämnen och bekräfta att analysreagensen fungerar.

De amplifierade DNA-målen detekteras med Molecular Beacons, ensträngiga oligonukleotid-hybridiseringssonder som bildar en stem-loop-struktur. Loopen innehåller en sondsekvens som är komplementär till en målsekvens, och stammen formas genom annealing av komplementära armsekvenser som finns på vardera sidan av sondsekvensen. En fluorofor, som fluorescerar när den exciteras av ljus med rätt våglängd, är kovalent bunden till en arms ände, och en utsläckare (quencher) som undertrycker fluoroforens fluorescens när de är fysiskt nära varandra är kovalent bunden till den andra armens ände. Molecular beacons fluorescerar inte när de är fria i lösning. När de däremot hybridiserar till en nukleinsyrasträng som innehåller en målsekvens, genomgår de en konformationsändring så att de kan fluorescera. Mängden fluorescens vid en given cykel, eller efter cyklning, beror av mängden specifika amplikoner vid det tillfället. Realtids-PCR-systemet följer samtidigt den fluorescens som emitteras av varje beacon.

¹ Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. Emerg Infect Dis: 10: 1713-20.

² Miller RF, Allen E, Copas A, Singer M, Edwards SG. Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. Thorax 2006; 61:716-21.

³ Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. (2001). New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. JAMA: 286: 2450-60.

⁴ Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM; ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). Proc Am Thorac Soc 2006;3:655-64.

⁵ Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

Försiktighetsmått

- Kitet är avsett att användas enbart av utbildad laboratoriepersonal. Procedurer behövs för att hantera prover utan aerosolbildning. Vid all provhantering ska normala försiktighetsmått och arbetsplatsens riktlinjer följas. Ett säkerhetsdatablad kan rekvireras från Myconostica Ltd.
- Testet är endast avsett för in vitro-diagnostik.
- Detta test ska enbart användas med Applied BioSystems 7500 med SDS-programvara version 1.4.
- Rören MicroAmp® Optical PCR strip (se avsnittet Utrustning och materiel) bör användas med kitet. Olika förbrukningsartiklar av plast kan göra analysresultaten felaktiga.
- Använd inte reagens eller kontroller om skyddspåsen är öppnad eller skadad vid leveransen.
- Reagens och kontroller är inte utbytbara mellan kit med olika lotnummer.
- Slå aldrig samman reagens eller kontroller från olika rör även om de har samma lotnummer.
- Använd aldrig reagens eller kontroller efter deras utgångsdatum.
- Reagenser och kontroller ska inte frysas om eller återanvändas efter öppnandet.
- Använd skyddskläder och engångshandskar när kitreagens hanteras.
- Undvik att förorena reagens med mikrober eller deoxyribonukleas (DNAs) när rörinnehållet delas upp.
- Vi rekommenderar användning av sterila, DNAs-fria filterspetsar med låg retention eller pipettspetsar med positiv undanträngning.
- Använd en ny spets till varje prov eller reagens.
- Kasta oanvänt reagens och avfall enligt gällande regler.
- För att undvika förorening med *Pneumocystis* eller IAC-amplikoner ska reaktionsrören inte öppnas efter amplifiering.
- Ytterligare kontroller kan testas enligt aktuella riktlinjer och regler.
- Åt, drick och rök inte i lokaler där prover eller kitreagens hanteras.
- Lågkoncentrerat DNA kan vara instabilt om det inte förvaras rätt. DNA-extrakt från kliniska prover bör förvaras vid –80 °C för att inte förfaras. Undvik så långt möjligt att upprepat tina och frysa om.

Kitinnehåll

Beskrivning

Kitet innehåller fem förseglade foliepåsar med tre fack, som kan användas separat. Varje påse innehåller tillräckligt med reagens för 8 reaktioner.

		<u>Volym</u>
Rör 1 (Orange propp)	dNTPs MgCl ₂ Buffrad lösning av DNA-polymeraskomplex	66 µL
Rör 2 (Blå propp)	<0,01 % primers <0,01 % Molecular Beacons <0,0001 % Internal Amplification Control (IAC) Internal Amplification Control är en rekombinant DNA-plasmid som innehåller en icke infektiös sekvens som inte är relaterad till målsekvensen (<i>Pneumocystis</i>) Tris-HCl-buffert	66 µL
Rör 3 (Klar propp)	Negativ kontroll Vatten	25 µL
Rör 4 (Svart propp)	Positiv kontroll <0,0001 % positivt kontroll-DNA Den positiva kontrollmolekylen är en rekombinant plasmid som innehåller <i>Pneumocystis</i> -målsekvensen Tris-HCl-buffert	25 µL

Kitet innehåller även följande:

- CD-ROM-skivan MycAssay™ Pneumocystis Myconostica Protocol
- Bruksanvisning
- Analyscertifikat

Förvaring

Kitet ska förvaras nedfrost (–15 till –25 °C) fram till det utgångsdatum som anges på kitlådans etikett. Efter detta datum ska kitet kastas enligt gällande bestämmelser.

När en påse öppnats, måste innehållet användas omedelbart. Det får inte frysas om eller användas vid ett senare tillfälle.

Utrustning och materiel som behövs men inte ingår

- Applied BioSystems Realtids-PCR-system (inkl. användarhandbok, tillhörande dator och programmet SDS, version 1.4).
- Remsa med 8 rör MicroAmp® Optical 8 (Applied BioSystems, best.nr. 4316567).
- Remsa med 8 proppar MicroAmp® Optical 8 (Applied BioSystems, best.nr. 4323032).
- Mikrocentrifug med 0,2 mL PCR-rörsadapter.
- Vortexblandare
- Ställ för PCR-rör.
- Mikropipetter (volym 7,5 µL – 20 µL)
- Sterila filterspetsar med låg retention
- Engångshandskar, puderfria
- Lösning för DNA-dekontaminering (handelsvara)
- Permanent märkpenna
- Kit för DNA-isolering (se nedan)

Provet

Provet för bestämning med MycAssay™ Pneumocystis är totalt DNA extraherat från kliniska BAL-prover. Nedanstående kit för isolering samt utrustning från Myconostica Ltd. rekommenderas till detta ändamål och användes under valideringen.

- MycXtra® Fungal DNA Extraction kit (best.nr. 080-005 från Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Vortex adapterplatta (best.nr. 080-015 från Myconostica)

Anmärkningar till proceduren

- Läs hela protokollet innan du börjar.
- Hela MycAssay™ Pneumocystis-processen (undantaget DNA-extrahering) tar ungefär 2 timmar, beroende på antalet prover som testas.
- Testet bör ställas upp på en PCR-arbetsstation eller i ett pre-PCR-laboratorium. Om det inte finns någon tillgänglig PCR-arbetsstation bör testet ställas upp i en speciell del av laboratoriet⁶ som regelbundet rengörs med DNA-dekontaminerande reagens.
- Undvik däremot att använda DNA-dekontaminerande reagens när Realtids-PCR ställs upp eftersom de kan störa analysen.
- Använd mikropipetter vid överföring av vätskor. Särskilda mikropipetter bör användas vid reaktionernas uppställning (set-up), och dessa bör regelbundet dekontamineras.
- Vi rekommenderar filterspetsar med låg retention för att säkerställa att inget DNA förloras under uppställningen.
- **Var försiktig vid hantering av rör 4. Det innehåller DNA-mallmaterial och kontaminering kan leda till falskt positiva testresultat.**
- Använd alltid handskar.
- Alla rör måste tillslutas efter användning och innan de kastas.
- Var noga med att märka rören på lämpligt sätt om flera patientprover bearbetas.

⁶ Exempel, se Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. / PCR Primer, 2nd Ed. (red. Dieffenbach och Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA.

Procedur för användningen:**1. Uppställning av realtids-PCR**

- 1.1 Starta först AB7500 Real-Time PCR System (instrumentet och dess dator) och starta programmet. Ange användarnamn och lösenord, om det behövs.
- 1.2 Kontrollera att arbetsområdet har rengjorts med DNA-dekontamineringsmedel och fått torka fullständigt. Använd inte sådana medel under uppställning av analysen, eftersom överskott av rengöringslösning kan inhibera PCR-reaktionerna.
- 1.3 En påse innehåller ett vardera av rören 1 till 4. Det finns tillräckligt med reagens i en påse för att köra 8 reaktioner. Minst en positiv och en negativ kontrollreaktion måste genomföras per körning med reagens från samma kitlot. Med en påse kan man alltså analysera 6 patientprover. Om fler än 6 prover ska testas, kan fler än en påse användas om påsarna är från samma kitlot. Högst 38 patientprover kan testas med de fem påsarna i ett kit.
- 1.4 Beräkna antalet reaktioner som behövs med hjälp av tabellen nedan.

Antal påsar	Högsta antal patientprover
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

- 1.5 Ta ut rätt antal påsar från frysen. Använd inte någon påse som inte längre är förseglad. Om patientproverna frysts efter extraheringen, ska även de tas ut ur frysen.
- 1.6 Riv upp så många påsar som behövs och ta ut rören. Om fler än en påse används, men bara en uppsättning positiva och negativa kontroller ska köras, är det bara nödvändigt att ta ut rören 3 och 4 från en av påsarna. **Var försiktig vid hantering av rör 4. Det innehåller positivt DNA-kontrollmaterial och kontaminering kan leda till falskt positiva testresultat.**
- 1.7 Låt rören tina i 5–10 minuter på laboriebänken, så att innehållet i alla rör är helt tinat innan arbetet fortsätter. Vortexblanda rören och patientproverna, följt av en kort körning i mikrocentrifug så att allt innehåll samlas i rörens botten före användning.
- 1.8 Sätt de PCR-rör som behövs i deras ställ. **Vidrör aldrig reaktionsrörens botten med händerna.**
- 1.9 Ställ alltid upp den negativa kontrollen först, och sedan patientproverna. Den positiva kontrollen ska alltid ställas upp sist.
- 1.10 Reagens- och DNA-volymer visas i tabellen nedan.

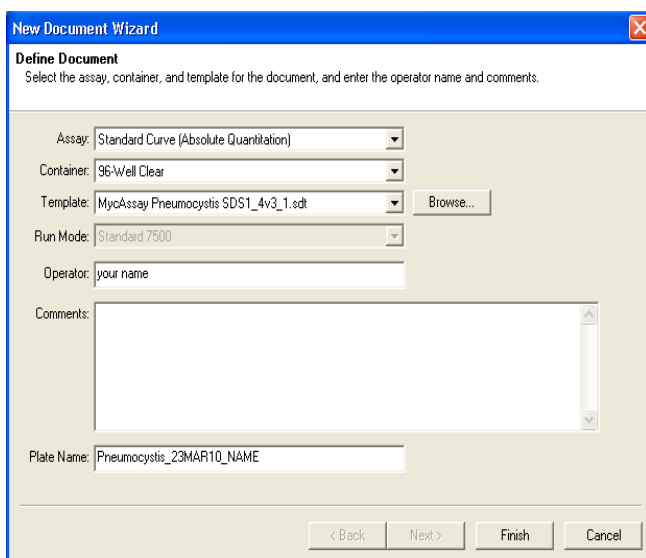
Reagens	Reaktion		
	Negativ kontroll	Patientprov	Positiv kontroll
Rör 1 (orange propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 2 (blå propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 3 (klar propp)	10 µL	-	-
Patientprov	-	10 µL	-
Rör 4 (svart propp)	-	-	10 µL
Totalvolym	25 µL	25 µL	25 µL

- 1.11 Tillsätt reagens i tabellens ordning: rör 1, sedan rör 2 och därefter mallen (negativ kontroll, patientprov eller positiv kontroll). Var försiktig vid uppdelning av rör 1. Vätskan är klibbig och kan fastna på rörets innerkant. I så fall ska röret centrifugeras igen, så att allt innehåll samlas i rörets botten innan de sista portionerna tas.
- 1.12 Använd en ny pipett till varje överföring av vätska. Förslut varje reagensrör efter användningen, och kasta det omedelbart tillsammans med eventuellt återstående innehåll i en behållare för kliniskt avfall som kan förslutas. Onvänt reagens kan inte sparas till senare användning.
- 1.13 Var extra noga vid pipettering från rör 4 (positivt kontroll-DNA) så att det inte kontaminerar något annat rör. Stäng locken på övriga rör innan rör 4 öppnas för att minska risken för överföring av material.

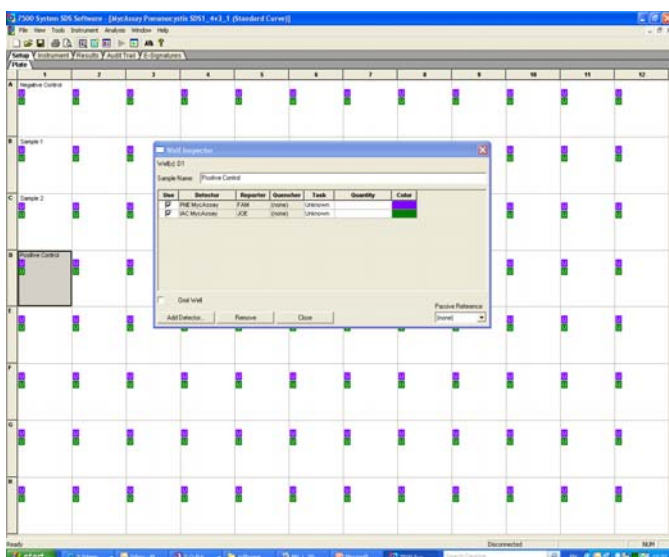
- 1.14 Kontrollera att alla proppar sitter ordentligt i rören. Anteckna platsen för varje prov i remsrören. Märk (exempelvis på locket) det första röret i varje remsa om fler än ett remsrör används. Kör rören i 10 sekunder i en minicentrifug med 0,2 mL adapter för PCR-rör. Kontrollera visuellt att det inte finns några bubblor i reaktionsblandningarna.
- 1.15 Fortsätt omedelbart till avsnitt 2. MycAssay™ Pneumocystis-reaktioner är stabila på bänken i upp till 60 minuter.
- 1.16 Kontrollera efter uppställningen (PCR set-up) att arbetsområdet är noggrant rengjort med DNA-dekontaminerande reagens.

2. Utföra körningen

- 2.1 Starta AB 7500 SDS-programmet version 1.4 och ange användarnamn och lösenord.
- 2.2 Sätt in CD-ROM-skivan **MycAssay Pneumocystis Myconostica Protocol**.
- 2.3 Välj det första alternativet, **Create New Document...**, från menyn **Quick Startup**.
- 2.4 Välj de inställningar som anges nedan. Välj mallen **MycAssay Aspergillus v1_2.sdt** från CD-ROM-skivan via **Browse...**
- 2.5 Ge körningen ett lämpligt Plate Name (plattnamn). Ett exempel visas nedan:



- 2.6 Klicka på **Finish**. Ett nytt dokument öppnas med PCR-parametrar och detektorer som ställs in automatiskt för den här analysen. I vyn **Plate** under fliken **Setup** använder du **Well Inspector** (välj en brunn och tryck på Ctrl+1 eller högerklicka med musen) för att ge brunnarna namn som stämmer med platserna för proverna i 1,14. Exempel:



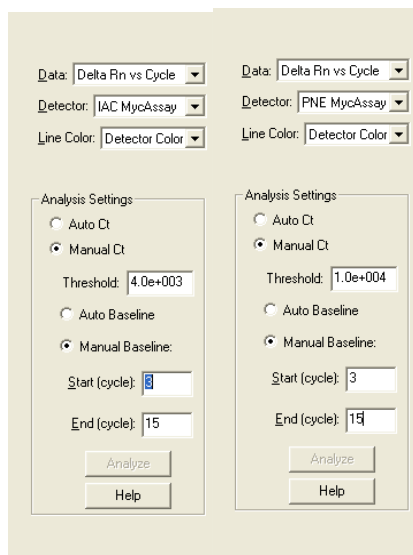
- 2.7 När alla brunnarna fått lämpliga namn sparar du körningen, och använder **Plate Name** (plattans namn) som filnamn.
- 2.8 Starta körningen på fliken **Instrument** genom att klicka på **Start**-knappen.
En nedräkning bredvid **Start**-knappen visar hur lång tid körningen tar.

3. Dataanalys och tolkning

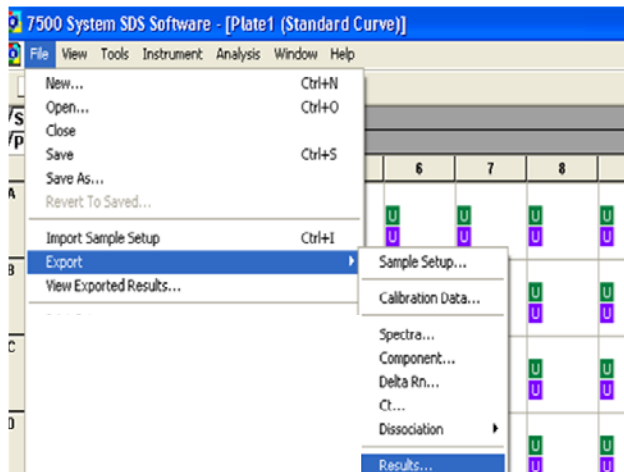
- 3.1 När körningen är klar, uppdaterar du genom att klicka på den gröna pilen på den översta menyraden.
3.2 Öppna vyn **Amplification Plot** under fliken **Result**. På den högra sidan anger du trösklar för varje kanal:
..

PNE MycAssay = 10000
IAC MycAssay = 4000

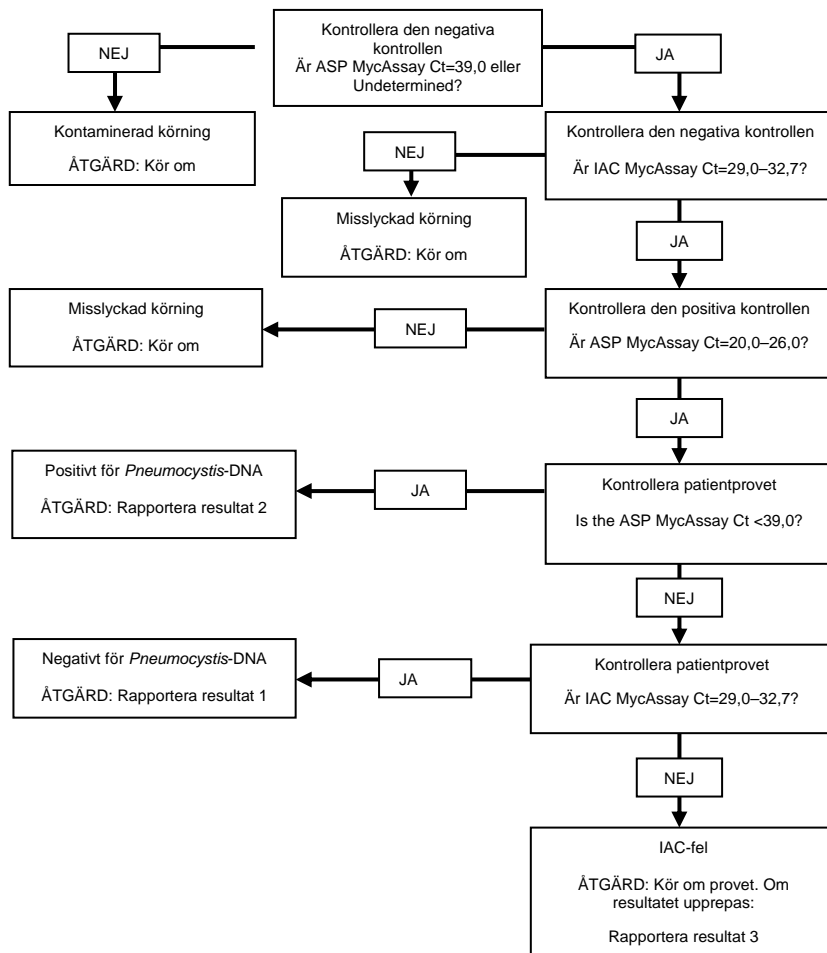
- 3.3 **Manual Baseline** ska vara kvar på 3–15 för båda detektorerna.
Klicka på knappen **Analyze** för att aktivera ändringarna. Exempel:



- 3.4 Spara ändringarna.
3.5 Välj de brunnar som innehåller prov, och exportera rapportfilen **File>Export>Results...** som visat nedan:



- 3.6 För att inte blanda samman data sparar du filen med samma namn som körningen. Kom ihåg att spara filen på en lämplig plats.
3.7 Vid uppmaningen aktiverar du **Export only selected wells**, och klickar på **OK**.
3.8 Öppna den sparade .csv-filen med Excel eller liknande kalkylarksprogram.
3.9 Analysera varje prov. Börja med kontrollerna enligt flödesschemat nedan (mer information finns även i tabellen under schemat):



Prov	PNE MycAssay Ct	IAC MycAssay Ct	Tolkning	Åtgärd
Negativ kontroll	39,0 eller obestämt	29,0–32,7	Negativ kontroll acceptabel	Patientresultat tillförlitliga
Negativ kontroll	39,0 eller obestämt	<29,0 eller >32,7	Fel i negativ kontroll	Upprepa hela körningen
Negativ kontroll	<39,0	29,0–32,7	Kontaminering	Upprepa hela körningen
Positiv kontroll	20,0–26,0	Ej tillämpligt	Positiv kontroll acceptabel	Patientresultat tillförlitliga
Positiv kontroll	<20,0 eller >26,0	Ej tillämpligt	Fel i positiv kontroll	Upprepa hela körningen
Patient	39,0 eller obestämt	29,0–32,7	Negativt för <i>Pneumocystis</i>	Rapportera resultat: Resultat 1*
Patient	<39,0	Ej tillämpligt	Positivt för <i>Pneumocystis</i>	Rapportera resultat: Resultat 2*
Patient	39,0 eller obestämt	<29,0 eller >32,7	IAC-fel i provet	Upprepa provet: Resultat 3*

Se Klinisk rapportering betr. resultat 1, 2 eller 3)

4. Felsökning

4.1 Den negativa kontrollen har givit en positiv signal i FAM-kanalen:

- Kontaminering under uppställningen (set up). Inget resultat från körningen är tillförlitligt.
- Gör om hela körningen och var extra noggrann vid tillsättning av mallarna, och speciellt för den positiva kontrollen (rör 4), så att oönskad överföring av material undviks.
- Se noga till att arbetsområdet och instrumenten är ordentligt dekontaminerade före och efter användning.
- Den negativa kontrollen var felplacerad i instrumentet.
- Kontrollera noga att alla reaktioner noterats rätt i programmet och att rörremsorna satts in åt rätt håll i maskinen.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Trösklar gäller endast om de rekommenderade MicroAmp®-rören och propparna har använts.

4.2 Ct-värdet för den negativa IAC-kontrollen ligger inte inom tillåtet område:

- PCR har inhiberats
- Kontrollera noga att arbetsområdet och instrumenten är helt torra efter dekontamineringen före PCR-uppställningen.
- Kitet har inte förvarats som angivet i avsnittet Förvaring, eller utgångsdatum har passerats.
- Kontrollera att kitet förvarats på rätt sätt. Kontrollera utgångsdatum för reagensen (anges på lådan och påsens etikett) och upprepa med icke utgången kit om det behövs.
- Reagens från rör 1 eller rör 2 hade inte tillsatts till PCR-reaktionen, eller dubbla mängden från rör 2 tillsattes.
- Gör om körningen och var noga med uppställningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser för höga eller för låga nivåer i ett reaktionsrör jämfört med andra.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Trösklar gäller endast om de rekommenderade MicroAmp®-rören och propparna har använts.

4.3 Den positiva kontrollen är negativ eller utanför tillåtet område:

- Kitet har inte förvarats som angivet i avsnittet Förvaring, eller utgångsdatum har passerats.
- Kontrollera att kitet förvarats på rätt sätt. Kontrollera utgångsdatum för reagensen (finns på lådan och påsens etikett) och upprepa med icke utgången kit om det behövs.
- Ett fel inträffade under uppställningen och den positiva kontrollens mall (rör 4) placerades i fel reaktionsrör.
- Upprepa körningen och var mycket noggrann under uppställningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser en högre vätskenivå i en reaktion och lägre i en annan, jämfört med normalt.
- Reagens från rör 1 eller rör 2 tillsattes inte till reaktionen.
- Gör om körningen och var noga med uppställningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser lägre vätskenivåer i den reaktionen jämfört med normalt
- Den positiva kontrollen var felplacerad i instrumentet.
- Kontrollera noga att alla reaktioner noterats rätt i programmet och att rörremsorna satts in åt rätt håll i maskinen.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Trösklar gäller endast om de rekommenderade MicroAmp®-rören och propparna har använts.

4.4 Patientprov(er) ger resultatet Outcome 3 – ”Invalid”:

- Det är troligt att ett eller flera extraherade patientprover innehåller PCR-inhibitorer.
- Vi rekommenderar att DNA från kliniska prover extraheras med kitet MycXtra® Fungal DNA Extraction kit.

4.5 Det finns inga resultat för någon kanal med prover eller kontroller:

- Kitet har inte förvarats som angivet i avsnittet Förvaring, eller utgångsdatum har passerats.
- Kontrollera att kitet förvarats på rätt sätt. Kontrollera utgångsdatum för reagensen (finns på lådan och påsens etikett) och upprepa med icke utgången kit om det behövs.
- Utrustningen fungerar inte optimalt.
- Kontrollera att realtids-PCR-instrumentets servicehistorik är uppdaterad och att det kalibrerats fullständigt enligt installations- och underhållshandböckerna.
- Ett felaktigt protokoll användes under programmets set-up.
- Se avsnitt 2 och välj rätt protokollfil för programmets typ och version från CD-ROM-skivan Myconostica Protocol. Endast rätt fil för programmet kan läsas in. Upprepa körningen med rätt protokollfil.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Trösklar gäller endast om de rekommenderade MicroAmp®-rören och propparna har använts.

Kontakta Technical Support (mycotech@myconostica.co.uk) om du har fler frågor eller om du får problem.

Egenskaper och begränsningar

Alla analytiska och kliniska prestandamått och påståenden om analysen MycAssay Pneumocystis bestämdes ursprungligen med Cepheid Smartcycler. För att validera överföringen av analysen till AB7500 realtids-PCR-plattformen, och för att visa ekvivalensen mellan de båda plattformarna, upprepades vissa analytiska studier på AB7500-plattformen. Resultaten av de studierna dokumenteras nedan. Studier som utförts med Cepheid Smartcycler® anges.

Analytisk sensitivitet

Med det ovan beskrivna protokollet och en rekombinant *Pneumocystis*-DNA-molekyl framtagen av Myconostica, bestämdes detekteringsgränsen (Limit of Detection, LoD) för *Pneumocystis* till <30 kopior. Värdet bestämdes med användning av en rekombinant DNA-plasmid som innehöll målsekvensen. *Pneumocystis*-målsekvensen är mitokondriell, och det finns många kopior per cell, men det är inte känt hur många.

Analytisk selektivitet

Analytisk selektivitet testades med DNA som extraherats från olika svamparter och andra arter. Följande arter gav inte positiva resultat:

Alternaria alternata, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Blastomyces capitatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cladosporium spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Doratomyces microsporus*, *Fusarium solani*, *Histoplasma capsulatum*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhodotonia rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon capitatum*. Följande bakteriearter gav inte positivt resultat: *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*.

Humant genomiskt DNA ger inte positivt resultat i denna analys.

Störande ämnen (kontraindikationer mot användning)

(Följande data erhöles med kitet MycAssay™ Pneumocystis under valideringsstudier med Cepheid SmartCycler®. Valideringen utfördes för att demonstrera de båda plattformarnas ekvivalens.)

Följande substanser testades vid kliniskt relevanta koncentrationer och befanns inte inhibera analysen: acetylcystein, amfotericin, beklometasondipropionat, budesonid, colistimetatnatrium, flutikasonpropionat, formoterolfumaratdihydrat, ipratropiumbromid, lidokain, mannitol, salbutamolsulfat, salmeterol, septrin (trimetoprim-sulfametoxazol), natriumklorid, natriumkromoglikat, terbutalin och tobramycin.

Prestandautvärdering

(Följande data erhöles med kitet MycAssay™ Pneumocystis under valideringsstudier med Cepheid SmartCycler®. Valideringen utfördes för att demonstrera de båda plattformarnas ekvivalens.)

Tröskeln Ct=39,0 fastställdes efter genomgång av en uppsättning prover från olika patientpopulationer.

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

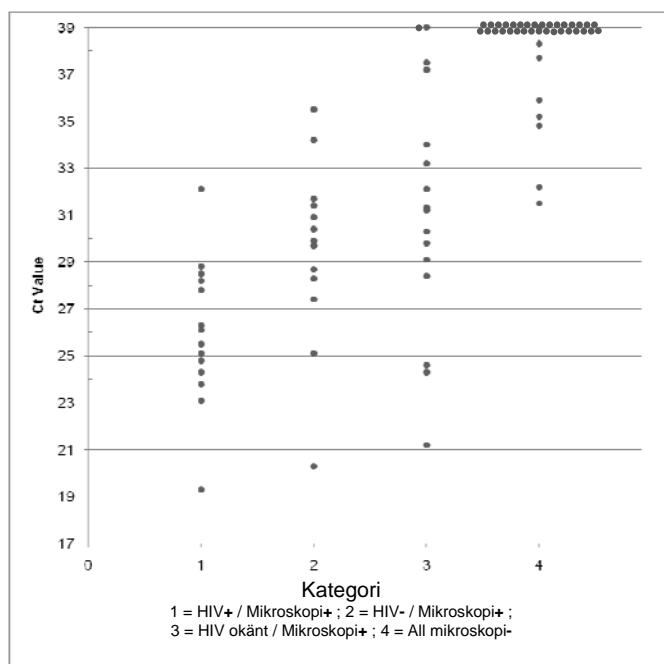
PCR jämfört med mikroskopidiagnos

	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 1: Diagnostisk specificitet och sensitivitet för kitet MycAssay™ Pneumocystis jämfört med immunfluorescensmikroskopi.

Tabell 1 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 1 (kolumn 3), eftersom denna grupp ingår i tabell 1.



Figur 1: Punktdiagram för Ct-värden erhållna från DNA extraherat från patienters luftvägar. Fyra grupper beskrivs.

Klinisk rapportering

Kitet MycAssay™ Pneumocystis är avsett som en hjälp vid diagnosticering av Pneumocystis-pneumoni. Resultaten måste bedömas tillsammans med patientens kliniska tillstånd och andra diagnostiska testresultat.

Följande rapportering rekommenderas, beroende av tolkningen av resultaten.

Resultat 1

"*Pneumocystis jirovecii* detekterades inte."

Resultat 2

"*Pneumocystis jirovecii* detekterades. Positivt resultat. Ange Ct-värde"

Resultat 3

"Testet misslyckades. Inhibitorer eller andra okända ämnen närvarande."

Ju lägre Ct-värde, desto högre sannolikhet för sjukdomen. Ct-värden nära tröskelvärdet 39,0 pekar troligare på kolonisering än infektion, men vissa patienter kan ha sjukdomen med mycket litet *P. jirovecii* närvarande, på grund av ett dåligt prov, föregående behandling eller arten av svampbelastning för just den patienten.

Procedurens begränsningar

- Procedurens principiella begränsningar är kopplade till primärprovets kvalitet.
 - Om provet är mycket litet eller inte tagits från den påverkade delen av lungan, kommer testet att vara mindre känsligt och kan bli falskt negativt.
 - BAL-prover bör centrifugeras innan DNA extraheras.
 - Data visade även att en minskning av den supernatantvolym som erhållits vid centrifugeringen och används vid extraheringen minskar andelen inhibitorer som införs i systemet.
- Trots att extraheringsproceduren MycXtra® Fungal DNA är konstruerad för att avlägsna PCR-inhibitorer har inte alla läkemedel eller patientpopulationer utvärderats.
- Proceduren har inte utvärderats fullt med sputum, och har inte utvärderats med saltsköljningar eller prover från barn.
- Falskt positiva resultat kan uppkomma genom extern kontaminering av primärprovet eller testet. Sådan kontaminering kan härröra från *P. jirovecii*-kontaminerad luft, dåligt utförande beträffande den positiva kontrollen eller extern kontaminering (särskilt vid pipettering) med *P. jirovecii*-DNA.
- Ett sant positivt resultat kan erhållas från patienter som är övergående eller permanent koloniserade med *P. jirovecii*. Kliniskt omdöme krävs därför vid tolkning av testresultaten.

LICENSER

TopTaq™ Hot Start tillhandahålls av QIAGEN. QIAGEN® är ett registrerat varumärke som tillhör Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland.

Den här produkten säljs under licens från Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, USA och får användas under PHRI-patent rättigheter endast för human in vitro-diagnostik.

Applied BioSystems är ett registrerat varumärke som tillhör Applera Corporation eller dess dotterbolag i USA och/eller vissa andra länder..

SmartCycler® är ett registrerat varumärke som tillhör Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, USA.



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

