

# MycAssay™ Pneumocystis

## Roche LightCycler® 2.0

### 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 validerats för användning med Roche LightCycler® 2.0.

#### 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 AIDS<sup>1</sup>. Den är typiskt samhällsförvärd och subakut, samt leder till fortskridande andningssvikt och död<sup>2</sup> om den inte behandlas. Profylax med trimetoprim-sulfamethoxazol (Bactrim eller Septrin) ges rutinmässigt 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 PCP<sup>3</sup>. 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 prover<sup>4</sup>.

MycAssay™ Pneumocystis är ett kit för molekylär diagnosticering för upptäckt av *P. jirovecii* baserat på Molecular Beacon<sup>5</sup>-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.

#### Analysens 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 oligonukleotidhybridiseringssonder 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. Roche LightCycler® 2.0 mäter samtidigt den fluorescens som emitteras av varje beacon.

#### Försiktighetsmått

- Kitet är avsett för *in vitro*-diagnostik.

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> 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.

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

- 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.
- Detta test är endast avsett att användas med Roche LightCycler® 2.0.
- 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 förurena 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.
- Ät, drick och rök inte i lokaler där prover eller kitreagens hanteras.
- Lågkoncentrerat DNA kan vara instabilt om det inte förvaras rätt. DNA-extrakt 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 <sub>2</sub> Buffrad lösning av DNA-polymeraskomplex	66 µL
Rör 2 (Blå propp)	<0,01 % primers <0,01 % Molecular Beacons <0,0001 % Internal Amplification Control (IAC) IAC är en rekombinant DNA-plasmid som innehåller en icke infektiös sekvens som inte är relaterad till målsekvansen ( <i>Pneumocystis</i> ) Tris-HCl-buffert	66 µL
Rör 3 (Genomskinlig 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> -målsekvansen 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

- Roche LightCycler® 2.0 realtids-PCR-system (inklusive bruksanvisning, tillhörande dator och LightCycler® programversion v4.1)
- LC 2.0 karusellcentrifug (valfria kapillärrörsadaptorer för minicentrifug)

- Provkarusell för kapillär rör på 20 µL
- LC 2.0 20 µL kapillär rör med proppar
- Kapillär rörshållare
- Frigöringsverktyg för kapillär rör
- Proppningsverktyg
- Mikrocentrifug
- Vortexblandare
- Mikropipetter (volymer 7,5 µL – 20 µL)
- Sterila filterspetsar med låg retention
- Engångshandskar, puderfria
- Lösning för DNA-dekontaminering (handelsvara)
- Kit för DNA-isolering (se nedan)
- MycAssay™ CC-kit (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 (referensnr. 080-005 från Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Adapterplatta till vortexblandare (referensnr. 080-015, från Myconostica)

## MycAssay™ Colour Compensation (CC) kit

Exakt analys av data som genererats med MycAssay™ Pneumocystis-analysen kräver att en färgkompensationsfil, skapad med Myconostica MycAssay™ CC-kit [referensnr. 080-080], används. När filen väl skapats kan den användas till flera körningar på samma apparat. Du kan få detaljerad information från din leverantör.

## 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 laboratoriet<sup>6</sup> 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 uppställningen, 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 kapillär rör måste tillslutas efter användning och innan de kastas.
- Gör exakta anteckningar i försöksplanen om placeringen av alla kapillär rör som innehåller relevanta prover i 32-positionskarusellen.
- Exakt analys av data kräver att en färgkompensationsfil, skapad med hjälp av Myconostica MycAssay™ CC-kitet, används.

<sup>6</sup> Se till exempel Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

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

- 1.1 Börja med att starta LightCycler® 2.0 realtids-PCR-systemet (instrument, tillhörande dator och centrifug) och det aktuella programmet. Ange användarnamn och lösenord och välj databasen Diagnostic. Om det är första körningen för dagen ska du göra ett självtest på instrumentet innan du ställer in en körning.
- 1.2 **Kom ihåg:** en färgkompensationskörning måste avslutas före analys av resultat för MycAssay™ Pneumocystis på LightCycler® 2.0. Denna behöver dock inte utföras före användningen av denna produkt och kan göras och användas på körningsfilerna i efterhand.
- 1.3 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.
- 1.4 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 patientprover ska testas, kan fler än en påse användas om påsarna är från samma kitlot. LightCycler® 2.0 har dock endast plats för upp till 32 prover per körning. Därför kan högst 30 patientprover köras samtidigt (4 påsar).
- 1.5 Beräkna antalet reaktioner som behövs med hjälp av tabellen nedan.

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

- 1.6 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.
- 1.7 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.**
- 1.8 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.
- 1.9 Sätt så många 20 µL kapillär rör i kapillär rörshållaren som behövs. Take care not to leave any marks on the glass.
- 1.10 Ställ alltid upp den negativa kontrollen först, och sedan patientproverna. Den positiva kontrollen ska alltid ställas upp sist.
- 1.11 Reagens- och DNA-volymer visas i tabellen nedan.

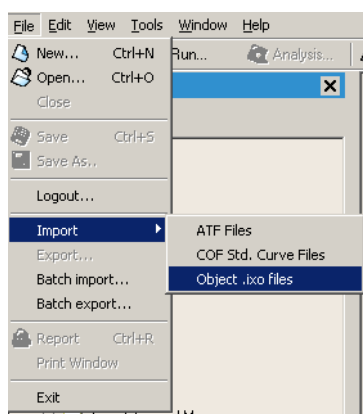
Reagens	Reaktion		
	Negativ kontroll	Patientprov	Positiv kontroll
Rör 1 (orange propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 2 (blå propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 3 (genomskinlig propp)	10 µL	-	-
Patientprov	-	10 µL	-
Rör 4 (svart propp)	-	-	10 µL
Totalvolym	25 µL	25 µL	25 µL

- 1.12 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.
- 1.13 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.

- 1.14 Var extra noga vid pipettering från Rör 4 (positivt kontroll-DNA) så att det inte kontaminerar någon annan reaktion. Du kan minska risken för korskontaminering om du proppar de övriga kapillärrören innan du öppnar Rör 4.
- 1.15 Med hjälp proppningsverktyget försluter du kapillärrören med de proppar som finns i kapillärrörslådan. Kontrollera att propparna sitter ordentligt i kapillärrören. Om du vill kan du proppa kapillärrören efter att mallen har tillsatts till reaktionen, för att minska risken för kors-/omgivningskontaminering.
- 1.16 Om karusellcentrifugen inte är tillgänglig centrifugerar du proverna i en minicentrifug med de medföljande adaptorerna och en hållare. I annat fall, fortsätt till 1.17.
- 1.17 Flytta mycket försiktigt alla kapillärrör till karusellen i precis samma ordning som de står i hållaren. Börja med det första kapillärröret på plats 1 och fortsätt i stigande följd utan att lämna några luckor. Tryck varje kapillärrör hela vägen ned tills det sitter ordentligt på plats.
- 1.18 Om proverna inte redan centrifugerats enligt punkt 1.16, centrifugerar du proverna i karusellcentrifugen LC 2.0.
- 1.19 Fortsätt omedelbart till Avsnitt 2. MycAssay™ Pneumocystis-reaktioner är stabila på bänken i upp till 60 minuter.
- 1.20 Kontrollera efter uppställningen (PCR set-up) att arbetsområdet är noggrant rengjort med DNA-dekontaminerande reagens.

## 2. Utföra körningen

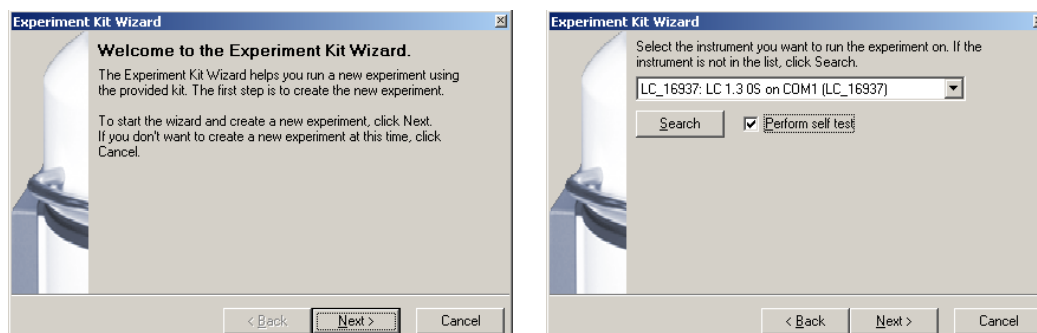
- 2.1 Sätt in CD-ROM-skivan **MycAssay Pneumocystis Myconostica Protocol**.
- 2.2 Gå till **Import** via katalogen **File** och välj **Object .ixo files**. Importera filen **Macro MAP v1.2.ix** från CD:n till din databas.



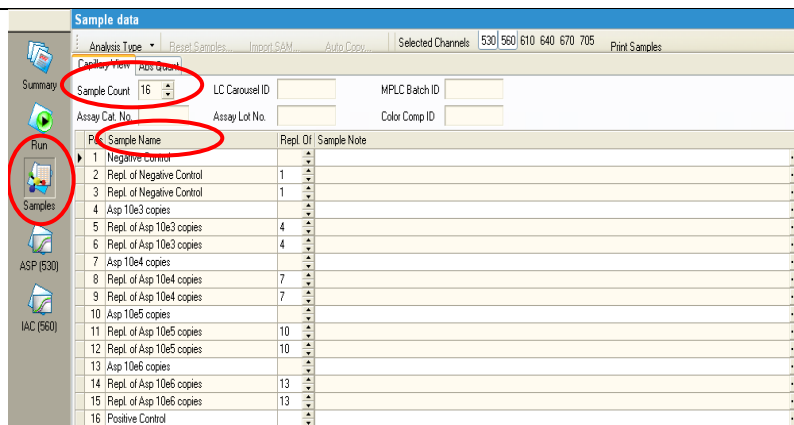
- 2.3 Gå till **Save** via katalogen **File** och spara makro på önskad plats i din databas.
- 2.4 Välj alternativet **Run Macro** i verktygsfältet.



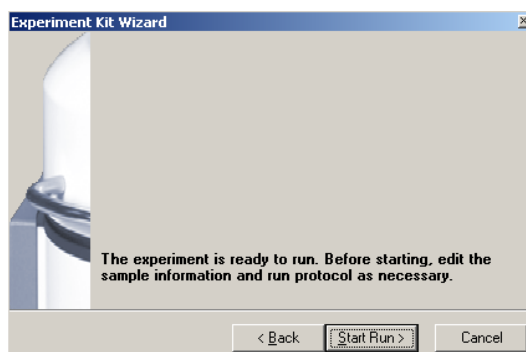
- 2.5 Välj mallfilen **Macro MAP v1.2** och tryck på **Open**.
- 2.6 Följ snabbguidens anvisningar. Markera rutan **Perform Self-Test** om detta är dagens första körning.



- 2.7 Ge körningsfilen ett namn och spara den på önskad plats.
- 2.8 Gå till avsnittet **Samples** genom att klicka på fliken till vänster på skärmen. Redigera antalet prover i rutan **Samples Count** och namnen under fliken **Capillary view**. Namnge proverna som i din försöksplan och enligt positionerna i karusellen.



- 2.9 Sätt den centrifugerade karusellen i LC 2.0-instrumentet. Kontrollera att skåran under provplats 1 på karusellen låser sig med stiftet på värmekammaren. Kontrollera att karusellen är ordentligt insatt i kammaren och stäng locket.
- 2.10 När du är klar trycker du på **Start-knappen**. Kontrollera att instrumentet har hittat alla kapillärrör i karusellen och att programmet har startat.

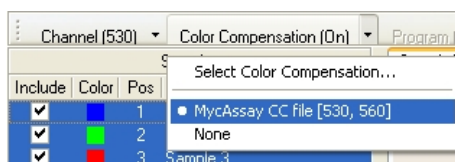


### 3. Dataanalys och tolkning

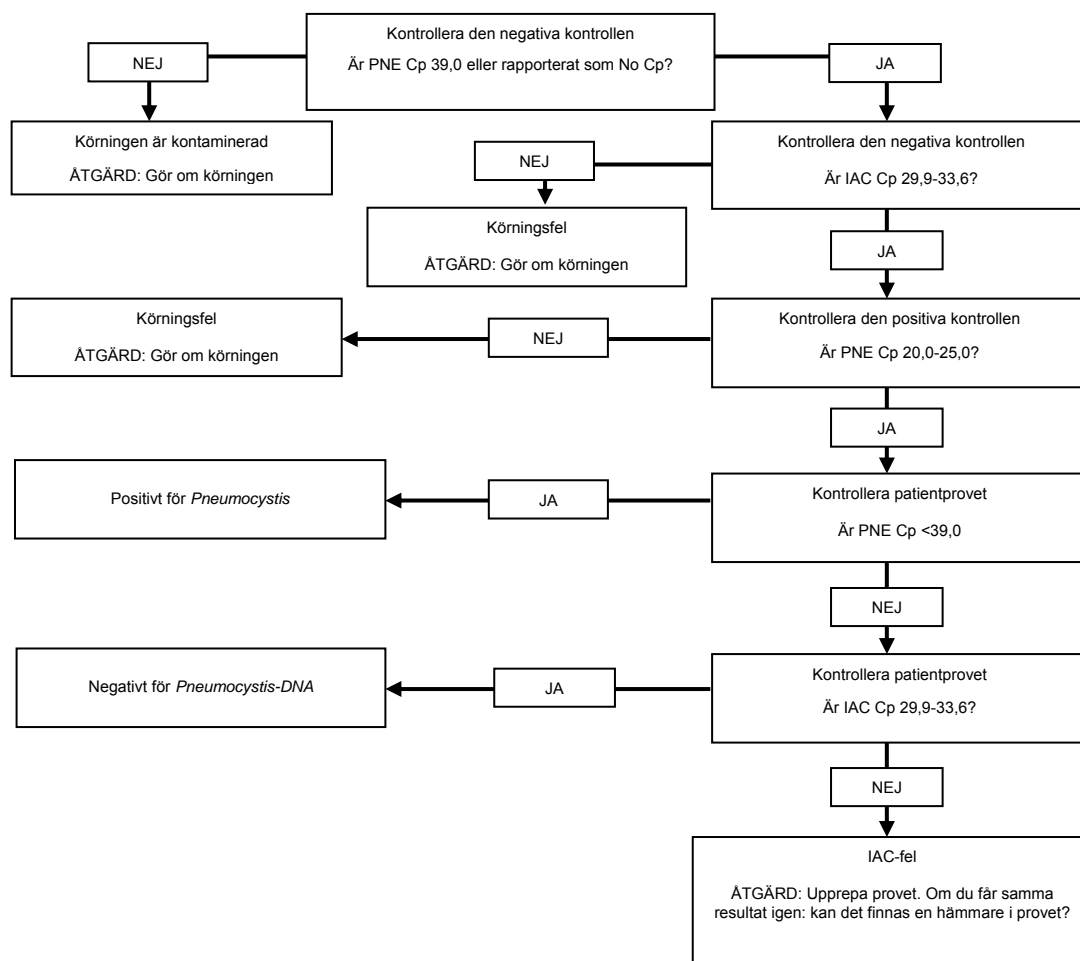
- 3.1 **Kom ihåg:** ett färgkompensationsobjekt måste användas före analys av resultat för MycAssay™ Pneumocystis på LightCycler® 2.0. Om du inte redan har skapat ett så gör du det nu, innan du fortsätter med dataanalysen och tolkningen.
- 3.2 När körningen är klar kontrollerar du innehållet i den rapport som öppnar sig och skriver ut den om du vill.
- 3.3 Pneumocystis-resultaten kan ses i PNE (530)-analyssektionen och IAC-resultaten i IAC (560)-analyssektionen.



- 3.4 I båda sektionerna, **PNE (530)** och **IAC (560)**, väljer du rätt färgkompensationsfil (**MycAssay CC file**) att använda för försöket.
- 3.5



3.6 Analysera varje prov. Börja med kontrollerna enligt flödesschemat nedan (mer information finns även i tabellen under schemat).



Prov	PNE (530) Cp	IAC (560) Cp	Tolkning	Åtgärd
Negativ kontroll	≥39,0 eller No Cp	Inom 29,9-33,6	Acceptabel negativ kontroll	Patientresultat tillförlitliga
Negativ kontroll	≥39,0 eller No Cp	<29,9 eller >33,6	Fel för negativ kontroll	Upprepa hela körningen
Negativ kontroll	<39,0	Inom 29,9-33,6	Kontamination	Upprepa hela körningen
Positiv kontroll	Inom 20,0-25,0	Ej tillämpligt	Acceptabel positiv kontroll	Patientresultat tillförlitliga
Positiv kontroll	<20,0 eller >25,0	Ej tillämpligt	Fel för positiv kontroll	Upprepa hela körningen
Patientprov	≥39,0 eller No Cp	Inom 29,9-33,6	Negativt för <i>Pneumocystis</i>	Rapportera resultat: Resultat 1
Patientprov	<39,0	Ej tillämpligt	Positivt för <i>Pneumocystis</i>	Rapportera resultat: Resultat 2
Patientprov	≥39,0 eller No Cp	<29,9 eller >33,6	IAC-fel i provet	Upprepa provet: Resultat 3

Se Klinisk rapportering (Resultat 1, 2 eller 3)

## 4. Felsökning

### 4.1 Den negativa kontrollen har givit en positiv signal i 530-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 att anteckningarna om kapillärrören är korrekta i programmet.

### 4.2 Cp-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 vätskenivåer i ett reaktionsrör jämfört med andra.
- Fel CC-fil användes till data.
- Skapa en CC-fil med hjälp av Myconostica MycAssay CC-kitet och använd denna till resultaten och gör om analysen. Du kan få detaljerad information om detta kit från leverantören i ditt område.

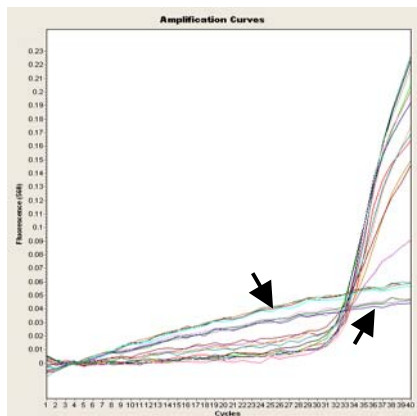
### 4.3 Den positiva kontrollen är negativ:

- 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 2 tillsattes inte till reaktionen.
- Gör om körningen och var noga med uppställningen. Sådana fel kan upptäckas genom att man ser lägre vätskenivåer i detta reaktionsrör jämfört med de andra.
- Den positiva kontrollen var felplacerad i instrumentet.
- Kontrollera att anteckningarna om kapillärrören är korrekta i programmet.

### 4.4 Patientprovet(-proverna) är negativa och IAC ligger utanför tillåtet område (Resultat 3):

- Det är troligt att ett eller patientprover innehåller PCR-hämmare.
- Vi rekommenderar att DNA från prover extraheras med kitet MycXtra™ Fungal DNA Extraction kit.

4.5 Patientprovet är negativt i PNE (530)-sektionen och IAC (560)-kurvan avviker anmärkningsvärt från den normala baslinjen (som i nedanstående bildexempel; pilarna visar onormala kurvor):



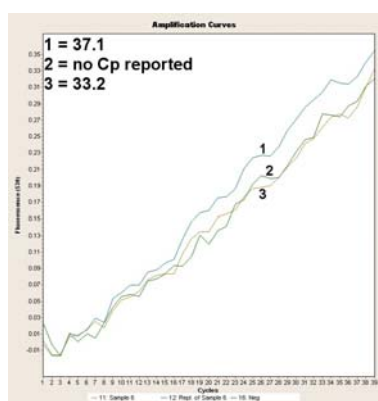
- PCR-reaktionen hämmades.
- Kontrollera nogga att arbetsområdet och instrumenten är helt torra efter dekontamineringen före PCR-uppställningen.
- Kör patientprovet en gång till. Om problemet upprepas finns det PCR-hämmare i provet. Rapportera provet som Undetermined.

4.6 Resultaten i IAC (560)-sektionen är nästan exakt likadana som resultaten i PNE (530)-sektionen.

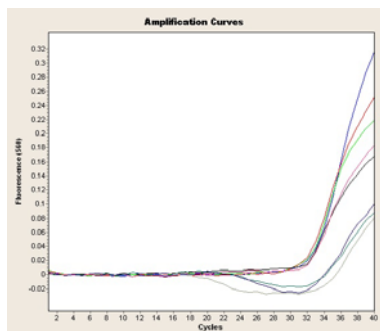
- Ingen eller fel färgkompensationsfil användes till försöksresultaten.
- I båda analyssektionerna ska du markera om färgkompensationen är ON (på) och att samma MycAssay CC-fil används för båda kanalerna.

4.7 Baslinjen för vissa prover är densamma som för den negativa kontrollen, vilket tyder på att ingen amplifiering har skett. Programmet har dock rapporterat ett positivt Cp-värde (som i nedanstående figur):

- Ett positivt Cp-värde för en negativ amplifieringskurva observerades endast två gånger på 154 negativa reaktioner utförda under valideringsstudierna.
- Om detta inträffar upprepar du provet/proverna för att bekräfta resultatet *Negative*.



**4.8 När jag använder mitt CC-objekt bildas en sänkning för vissa data i 560 IAC-kanalen, vilket leder till Cp-värden utanför det godkända området:**



- Detta är helt normalt för reaktioner som innehåller höga koncentrationer av mål-DNA och stör inte tolkningen av patientresultaten.
- Följ den normala analysen; du upptäcker att för prover som är positiva för *Pneumocystis*, krävs inget IAC-resultat för ett resultatbeslut för patienten.

**4.9 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 utgånget 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.

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

## Egenskaper och begränsningar

### Analytiska prestandadata för LightCycler® 2.0

Kitet validerades ursprungligen med Cepheid SmartCycler®. Vissa påståenden om analysens prestanda omvaliderades på Roche LightCycler® 2.0-plattformen med 20 µL kapillärrör av glas (Roche, artikelnr. 04929292001 eller 11909339001), och rapporteras nedan. Där skillnaderna mellan plattformarna inte förväntades påverka analysens prestanda och därmed vad som hävdas, upprepades inte studien. Sådana resultat från SmartCycler® anses överförbara till plattformen LightCycler® 2.0.

### 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*, *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*.

### Följande påståenden om prestanda bekräftades med Cepheid SmartCycler®

#### Störande ämnen (kontraindikationer mot användning)

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

Humant genomiskt DNA ger inte positivt resultat i denna analys.

### Prestandautvärdering

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

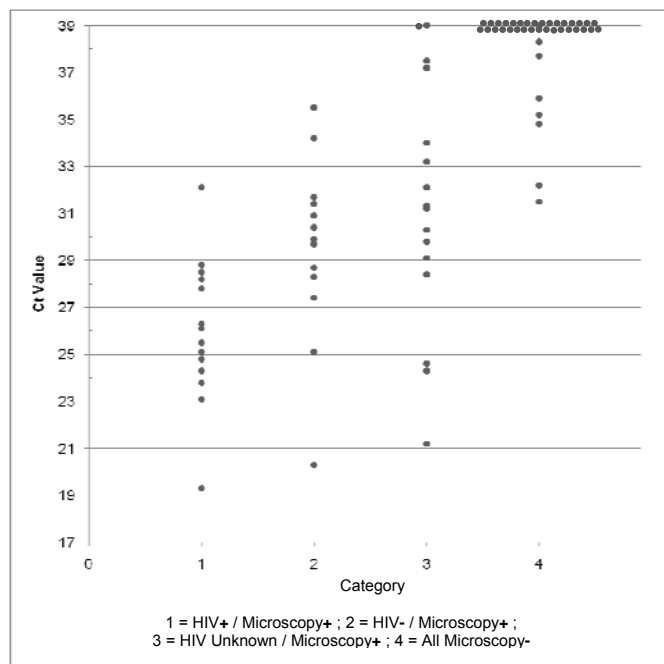
Prover från luftvägar (BAL) som insamlats från 2 sjukhus, extraherats med kitet MycXtra™ och förvarats, användes för att utvärdera kitet MycAssay™ Pneumocystis. PCR-resultaten jämfördes med immunfluorescensmikroskopi.

#### 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 obestämmd 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 1 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 tröskelvärde 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.

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

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

LightCycler® är ett registrerat varumärke som tillhör Roche Diagnostics, GmbH.



Myconostica Limited, South Court, Sharston Road, Sharston, Manchester, M22 4SN, Storbritannien.  
Telefon: +44 (0) 161 998 7239 Fax: +44 (0) 161 902 2496

e-post: mycotech@myconostica.co.uk

