

MycAssay™ Pneumocystis

Cepheid SmartCycler®

Αναπνευστικά δείγματα

REF 080-035

Προβλεπόμενη χρήση

Το MycAssay™ Pneumocystis προορίζεται για χρήση από εξειδικευμένους επαγγελματίες εργασθηρίων για την ποιοτική ανίχνευση γονιδιωματικού DNA του *Pneumocystis jirovecii*, απομονωμένου από δείγματα της κατώτερης αναπνευστικής οδού (π.χ. βρογχικά δείγματα) ως διαγνωστικό βοήθημα σε ενήλικες ασθενείς με υπόνοια πνευμονίας από *P. jirovecii*.

Το MycAssay™ Pneumocystis έχει επικυρωθεί για χρήση μαζί με το Cepheid SmartCycler® (με χρήση των εκδόσεων 1.7b και 3.0 του λογισμικού Dx)

Περίληψη και εξήγηση

Η πνευμονία από *Pneumocystis jirovecii* (παλαιότερα *carinii*) (PCP) είναι μία συχνή ευκαιριακή πνευμονία σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, ιδιαίτερα εκείνους με προχωρημένη λοίμωξη από HIV και AIDS¹. Αποκτάται συνήθως στην κοινότητα, έχει υποξεία εκδήλωση και εάν δεν αντιμετωπιστεί, οδηγεί σε προοδευτική αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο². Σε πολλούς ασθενείς κινδύνου χορηγείται προφυλακτικά τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (Bactrim ή Septrin), μία πρακτική η οποία έχει μειώσει σημαντικά την επίπτωση της PCP, συμβαίνοντας ωστόσο εξάρσεις και εκείνοι που δεν γνωρίζουν ότι είναι θετικοί στον ιδί HIV μπορεί να προσέλθουν με AIDS και PCP³. Η PCP προσβάλλει επίσης και άλλους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων των δεκτών μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων, όπως και επίσης τους νοσούντες από υπογαμμασφαιριναιμία και χρόνια λευχαιμία.

Για τη διάγνωση της PCP εφαρμόζονται σήμερα μικροσκοπικές μέθοδοι, και αυτό γιατί η *P. jirovecii* δεν μπορεί να καλλιεργηθεί σε μικροβιολογικά εργαστήρια ρουτίνας. Η βροχοπνευμονική έκπλυση (BAL) αποτελεί την προτιμώμενη μέθοδο συλλογής δειγμάτων. Οι συνήθεις μέθοδοι διάγνωσης περιλαμβάνουν τον ανοσοφθορισμό (IF) ή τον άμεσο φθορισμό και την ιστολογική χρώση των δειγμάτων⁴.

Το MycAssay™ Pneumocystis είναι ένα μοριακό διαγνωστικό kit για την ανίχνευση της *P. jirovecii* που βασίζεται στην τεχνολογία PCR με Μοριακούς φάρους (Molecular Beacon)⁵. Η όλη διαδικασία της δοκιμασίας, συμπεριλαμβανομένης της απομόνωσης DNA από το κλινικό δείγμα, μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 4 ώρες, ή μόλις 2 ώρες εάν υπάρχει ήδη διαθέσιμο απομονωμένο DNA. Ο προσδιορισμός έχει το άμεσο πλεονέκτημα της βελτιωμένης εργαστηριακής αποτελεσματικότητας σε συνδυασμό με μία ταχεία δοκιμασία, οδηγώντας σε πιθανά κλινικά οφέλη. Η διαγνωστική ακρίβεια της δοκιμασίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του δείγματος.

Αρχές της διαδικασίας

Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων στο kit MycAssay™ Pneumocystis με δείγμα που περιέχει την ακολουθία-στόχο DNA από *Pneumocystis* (μία μεγάλη ριβοσωμική υπό-ομάδα μιτοχονδρίων της *Pneumocystis*), η θερμοκυκλοποίηση θα οδηγήσει σε ενίσχυση του DNA. Ο προσδιορισμός περιέχει επίσης έναν Έσωτερικό Μάρτυρα Ενίσχυσης (Internal Amplification Control - IAC), ένα τεμάχιο DNA που δεν υπάρχει στην *Pneumocystis* ή σε άλλα μυκητιακά, βακτηριακά ή ανθρώπινα γονιδιώματα, για την ανίχνευση ανασταλτικών ουσιών της PCR και για την επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των αντιδραστηρίων προσδιορισμού.

Οι ενισχυμένοι στόχοι DNA ανιχνεύονται με Μοριακούς φάρους, μονόκλωνους ανιχνευτές υβριδισμού ολιγονουκλεοτιδίων που σχηματίζουν μια δομή στελέχους-βρόχου. Ο βρόχος περιέχει μία ακολουθία ανιχνευτή συμπληρωματική προς την ακολουθία-στόχο. Το στέλεχος σχηματίζεται από την ανασύνδεση συμπληρωματικών ακολουθιών βραχίονα που βρίσκονται στις δύο πλευρές τις ακολουθίας ανιχνευτή. Ένα φθοροφόρο, το οποίο φθορίζει μόλις διεγερθεί από φως κατάλληλου μήκους κύματος, συνδέεται ομοιοπολικά στο άκρο του ενός βραχίονα και ένας αδραντοποιητής, ο οποίος καταστέλλει το φθορισμό του φθοροφόρου όταν το πλησιάζει, συνδέεται ομοιοπολικά στο άκρο του άλλου βραχίονα. Οι Μοριακοί φάρου δεν φθορίζουν όταν βρίσκονται ελεύθεροι σε διάλυμα. Όταν ωστόσο υβριδοποιούνται σε κλώνο νουκλεοτιδίου που περιέχει μία ακολουθία στόχο, υποβάλλονται σε μία διαμορφωτική μεταβολή που επιτρέπει το φθορισμό τους. Η ποσότητα φθορισμού σε οποιοδήποτε κύκλο, η μετά από κυκλοποίηση εξαρτάται από την ποσότητα των ειδικών προϊόντων ενίσχυσης που υπάρχουν εκείνη τη στιγμή. Το Σύστημα PCR Πραγματικού χρόνου SmartCycler® παρακολουθεί ταυτόχρονα το φθορισμό που εκπέμπει κάθε φάρος.

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.

Προφυλάξεις

- Το κιτ προορίζεται μόνο για χρήση από επαγγελματίες εργαστηρίων. Οι διαδικασίες χειρισμού των δειγμάτων πρέπει να γίνονται σε περιβάλλον χωρίς αερολύματα. Για το χειρισμό όλων των δειγμάτων πρέπει να ακολουθούνται τυπικές προφυλάξεις και οι κατευθυντήριες οδηγίες της εκάστοτε μονάδας. Ένα Φύλλο Πληροφοριών Ασφάλειας Υλικού είναι διαθέσιμο από τη Myconostica Ltd.
- Αυτή η δοκιμασία προορίζεται μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Αυτή η δοκιμασία θα πρέπει να εκτελείται μόνο με το σύστημα Cepheid SmartCycler®, με χρήση των εκδόσεων 1.7b και 3.0 του διαγνωστικού λογισμικού Dx.
- Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια ή μάρτυρες εάν οι προστατευτικές κυψέλες είναι ανοικτές ή έχουν ραγεί κατά την παραλαβή τους.
- Τα αντιδραστήρια και οι μάρτυρες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κιτ με διαφορετικό αριθμό παρτίδας.
- Ποτέ μην συγκεντρώνετε μαζί αντιδραστήρια ή μάρτυρες από διαφορετικά σωληνάρια, ακόμη και αν είναι μέρος της ίδιας παρτίδας.
- Ποτέ μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια ή τους μάρτυρες μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Τα αντιδραστήρια και οι μάρτυρες δεν θα πρέπει να επαναψύχονται ή να επαναχρησιμοποιούνται μετά το άνοιγμά τους.
- Φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μίας χρήσης όταν χειρίζεστε τα αντιδραστήρια του κιτ.
- Αποφύγετε μικροβιακή επιμόλυνση και επιμόλυνση δεσοξυριβονουκλεάσης (DNAση) των αντιδραστηρίων όταν αφαιρείτε κλάσματα από σωληνάρια.
- Συνιστάται η χρήση αποστειρωμένων, ελεύθερων DNAσης ρυγχών φίλτρου χαμηλής κατακράτησης μίας χρήσης ή ρυγχών πιπέτας θετικής μετατόπισης.
- Χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος για κάθε δείγμα ή αντιδραστήριο.
- Απορρίψτε μη χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια και απορρίμματα σύμφωνα με τους εθνικούς, ομοσπονδιακούς, δημοτικούς και τοπικούς κανονισμούς.
- Για να αποφύγετε επιμόλυνση με *Pneumocystis* ή προϊόντα ενίσχυσης μάρτυρα εσωτερικού ελέγχου (IAC), μην ανοίξετε τα σωληνάρια αντίδρασης μετά την ενίσχυση.
- Μπορούν να ελεγχθούν περισσότεροι μάρτυρες, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ή τις απαιτήσεις τοπικών, δημοτικών, περιφερειακών και/ή ομοσπονδιακών οργανισμών ή οργανισμών διαπίστευσης.
- Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε σε περιοχές χειρισμού δειγμάτων ή αντιδραστηρίων του κιτ.
- Οι χαμηλές συγκεντρώσεις DNA μπορεί να είναι ασταθείς εάν δεν φυλάσσονται σωστά. Συνιστάται η φύλαξη απομονωμένων DNA από κλινικά δείγματα στους -80°C για τη διατήρηση της ακεραιότητάς τους. Θα πρέπει επίσης να αποφεύγονται επαναλαμβανόμενες αποψύξεις και εκ νέου καταψύξεις, όπου αυτό είναι δυνατό.

Περιεχόμενα του κιτ

Περιγραφή

Το κιτ αποτελείται από πέντε σφραγισμένες κυψέλες μεμβράνης τριών διαμερισμάτων, κάθε μία από τις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξεχωριστά. Κάθε κυψέλη περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για 8 αντιδράσεις.

Όγκος

Σωληνάριο 1 (πορτοκαλί καπάκι)	dNTPs MgCl ₂ Ρυθμισμένο διάλυμα συμπλόκου DNA πολυμεράσης	66 μL
Σωληνάριο 2 (μπλε καπάκι)	<0,01% Εκκινητές <0,01% Μοριακοί φάροι <0,0001% Εσωτερικός Μάρτυρας Ενίσχυσης (IAC) Ο Εσωτερικός Μάρτυρας Εκκίνησης είναι ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο DNA που περιέχει μία μη μολυσματική ακολουθία, η οποία δεν σχετίζεται με καμία ακολουθία- στόχο (<i>Pneumocystis</i>) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl	66 μL
Σωληνάριο 3 (διαφανές καπάκι)	Αρνητικός μάρτυρας Νερό	25 μL
Σωληνάριο 4 (μαύρο καπάκι)	Θετικός μάρτυρας <0,0001% DNA θετικού μάρτυρα Το μόριο του Θετικού μάρτυρα είναι ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει τις ακολουθίες-στόχους της <i>Pneumocystis</i> . Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl	25 μL

Το κιτ περιέχει επίσης:

- Δίσκο CD-ROM του πρωτοκόλλου MycAssay™ Pneumocystis της Myconostica
- Οδηγίες Χρήσης
- Πιστοποιητικό ανάλυσης

Φύλαξη

Το κιτ θα πρέπει να φυλάσσεται κατεψυγμένο (-15 έως -25 °C) έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του κουτιού του κιτ και πρέπει να απορρίπτεται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς.

Τα περιεχόμενα της κυψέλης πρέπει να χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά το άνοιγμά της και δεν πρέπει να καταψυχθούν εκ νέου ή να επαναχρησιμοποιηθούν.

Απαιτούμενος εξοπλισμός/υλικά που δεν παρέχονται

- Σύστημα PCR Πραγματικού χρόνου Cepheid SmartCycler® (συμπεριλαμβανομένου εγχειριδίου χρήσης, προσαρτημένου επιτραπέζιου υπολογιστή και εκδόσεων λογισμικού 1.7b ή 3.0d του διαγνωστικού λογισμικού Dx)
- Μίνι φυγόκεντρος, ειδικά προσαρμοσμένη για τα σωληνάρια αντίδρασης SmartCycler®
- Μικροφυγόκεντρος
- Αναδευτήρας τύπου Vortex
- Σωληνάρια αντίδρασης SmartCycler®
- Πλαστικό ράφι στήριξης για τα σωληνάρια αντίδρασης SmartCycler®
- Μικροπιπέτες (απαιτούμενοι όγκοι 7,5 µL – 20 µL)
- Στείρα ρύγχη φίλτρου, χαμηλής κατακράτησης
- Γάντια μίας χρήσης, χωρίς ταλκ
- Ιδιόκτητο διάλυμα απολύμανσης DNA
- Ανεξιτήλος μαρκαδόρος
- Κιτ απομόνωσης DNA (βλ. παρακάτω)

Δείγμα

Το δείγμα για τον προσδιορισμό MycAssay™ Pneumocystis είναι ολικό DNA απομονωμένο από κλινικά δείγματα βρογχοπνευμονικής έκπλυσης (BAL). Για το σκοπό αυτό συνιστάται το ακόλουθο κιτ και ο εξοπλισμός απομόνωσης DNA, τα οποία παρέχει η Myconostica Ltd., και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση:

- Κιτ απομόνωσης μυκητιακού DNA MycXtra® (ΚΩΔ.: 080-005 διαθέσιμο από τη Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, Η.Π.Α.)
- Πλάκα προσαρμογής Vortex (ΚΩΔ.: 080-015 διαθέσιμη από τη Myconostica)

Σημειώσεις για τη διαδικασία

- Διαβάστε το πρωτόκολλο μέχρι τέλους προτού ξεκινήσετε.
- Ολόκληρη η διαδικασία MycAssay™ Pneumocystis (εξαιρουμένης της απομόνωσης DNA) διαρκεί περίπου 2 ώρες, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα ελεγχθούν.
- Η προετοιμασία της διαδικασίας πρέπει να γίνεται σε σταθμό εργασίας PCR ή σε εργαστήριο προπαρασκευής PCR. Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος σταθμός εργασίας PCR, η δοκιμασία πρέπει να προετοιμάζεται σε αποκλειστική για το σκοπό αυτό περιοχή του εργαστηρίου⁶, η οποία καθαρίζεται τακτικά με αντιδραστήρια απολύμανσης DNA.
- Αποφύγετε ωστόσο τη χρήση αντιδραστηρίων απολύμανσης DNA όταν εκτελείτε την PCR Πραγματικού χρόνου διότι μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στον προσδιορισμό.
- Χρησιμοποιήστε μικροπιπέτες για τη μεταφορά υγρών. Για την προετοιμασία αυτών των αντιδράσεων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικές για το σκοπό αυτό μικροπιπέτες, οι οποίες και θα πρέπει να απολυμαίνονται τακτικά.
- Για να διασφαλίσετε πως δεν θα υπάρξουν απώλειες DNA κατά τη διαδικασία προετοιμασίας, συνιστάται η χρήση ρυγχών φίλτρου χαμηλής κατακράτησης.
- **Κατά το χειρισμό του Σωληναρίου 4 απαιτείται προσοχή. Περιέχει υλικό DNA μήτρας και τυχόν επιμόλυνση θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.**
- Φοράτε συνεχώς γάντια.
- Κλείνετε όλα τα σωληνάρια με το καπάκι τους μετά τη χρήση και πριν από την απόρριψή τους.
- Προσέξτε να επισημάνετε σωστά τα σωληνάρια αντίδρασης SmartCycler® όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία περισσότερα δείγματα ασθενών.

⁶ For example see 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.

Διαδικασία για τη χρήση:

1. Προετοιμασία PCR Πραγματικού χρόνου

- 1.1 Για να ξεκινήσετε, ενεργοποιήστε το σύστημα PCR Πραγματικού χρόνου Smart Cycler® (όργανο και συνοδεύων υπολογιστής) και τρέξτε το σχετικό λογισμικό. Εισάγετε τα ονόματα χρήστη και τους κωδικούς πρόσβασης που θα σας ζητηθούν.
- 1.2 Βεβαιωθείτε πως η περιοχή εργασίας έχει καθαριστεί πλήρως με χρήση αντιδραστηρίων απολύμανσης DNA και έχει στεγνώσει τελείως. Αποφύγετε τη χρήση αυτών των αντιδραστηρίων κατά την προετοιμασία του προσδιορισμού, διότι τυχόν περίσσεια του διαλύματος καθαρισμού μπορεί να δράσει ανασταλτικά στις αντιδράσεις PCR.
- 1.3 Κάθε κυψέλη περιέχει ένα Σωληνάριο 1, ένα Σωληνάριο 2, ένα Σωληνάριο 3 και ένα Σωληνάριο 4. Μία κυψέλη περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 8 αντιδράσεων. Τουλάχιστον μία αντίδραση θετικού μάρτυρα και μία αντίδραση αρνητικού μάρτυρα πρέπει να διενεργηθούν ανά εκτέλεση, όπου τα αντιδραστήρια προέρχονται από μία μόνο παρτίδα κιτ. Μία κυψέλη μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση 6 δειγμάτων ασθενών. Εάν πρέπει να εξεταστούν περισσότερα από 6 δείγματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μια κυψέλη, εάν οι κυψέλες που θα χρησιμοποιηθούν προέρχονται από την ίδια παρτίδα κιτ. Μπορούν να εξεταστούν έως και 38 δείγματα ασθενών με χρήση των 5 κυψελών ανά κιτ.
- 1.4 Υπολογίστε τον αριθμό των απαιτούμενων αντιδράσεων σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Αριθμός κυψελών	Μέγιστος αριθμός δειγμάτων ασθενών
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

- 1.5 Αφαιρέστε τον ενδεδειγμένο αριθμό κυψελών από τον καταψύκτη. Μη χρησιμοποιήσετε καμία κυψέλη που δεν είναι πλέον σφραγισμένη. Εάν τα δείγματα ασθενών καταψύχθηκαν μετά την απομόνωση, αφαιρέστε κι αυτά από τον καταψύκτη.
- 1.6 Ανοίξτε τον απαιτούμενο αριθμό κυψελών αφαιρώντας τη μεμβράνη και αφαιρέστε τα σωληνάρια. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία κυψέλες, αλλά εκτελεστεί ένα μόνο σετ θετικών και αρνητικών μαρτύρων, αφαιρέστε μόνο τα Σωληνάρια 3 και 4 από μία κυψέλη. **Κατά το χειρισμό του Σωληναρίου 4 απαιτείται προσοχή. Περιέχει υλικό DNA θετικού μάρτυρα και τυχόν επιμόλυνση θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.**
- 1.7 Τοποθετήστε τα σωληνάρια στον πάγκο του εργαστηρίου για 5-10 λεπτά μέχρι να αποψυχθούν και βεβαιωθείτε πως τα περιεχόμενα κάθε σωληναρίου έχουν αποψυχθεί πλήρως προτού συνεχίσετε. Αναδεύστε τα περιεχόμενα των σωληναρίων και τα δείγματα ασθενών σε αναδευτήρα Vortex. Κατόπιν φυγοκεντρίστε σύντομα σε μικροφυγόκεντρο για να διασφαλίσετε τη συλλογή όλων των περιεχομένων στον πυθμένα των σωληναρίων πριν από τη χρήση.
- 1.8 Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό σωληναρίων αντίδρασης SmartCycler® στα ράφια στήριξής τους. **Ποτέ μην αγγίζετε το διαμαντόσχημο θάλαμο αντίδρασης των σωληναρίων αντίδρασης με τα χέρια σας.**
- 1.9 Προετοιμάζετε πάντοτε πρώτα τον αρνητικό μάρτυρα και κατόπιν τα δείγματα ασθενών. Ο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να προετοιμάζεται πάντοτε τελευταίος.
- 1.10 Στον ακόλουθο πίνακα αναγράφονται οι όγκοι αντιδραστηρίων και DNA:

Αντιδραστήριο	Αντίδραση		
	Αρνητικός μάρτυρας	Δείγμα ασθενούς	Θετικός μάρτυρας
Σωληνάριο 1 (Πορτοκαλί καπάκι)	7,5 μL	7,5 μL	7,5 μL
Σωληνάριο 2 (Μπλε καπάκι)	7,5 μL	7,5 μL	7,5 μL
Σωληνάριο 3 (Διαφανές καπάκι)	10 μL	-	-
Δείγμα ασθενούς	-	10 μL	-
Σωληνάριο 4 (Μαύρο καπάκι)	-	-	10 μL
Ολικός όγκος	25 μL	25 μL	25 μL

- 1.11 Προσθέστε αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνεται στον ανωτέρω πίνακα: Σωληνάριο 1, μετά Σωληνάριο 2, και κατόπιν η μήτρα (αρνητικός μάρτυρας, δείγμα ασθενούς ή θετικός μάρτυρας). Προσέχετε κατά την αφαίρεση κλασμάτων από το Σωληνάριο 1. Το υγρό είναι ελαφρώς ιξώδες και μπορεί να προσκολληθεί στο εσωτερικό χείλος του σωληναρίου. Εάν συμβεί αυτό, φυγοκεντρίστε ξανά για να συλλέξετε και τα τελευταία περιεχόμενα στον πυθμένα του σωληναρίου προτού επιχειρήσετε να αφαιρέσετε τα τελευταία κλάσματα.
- 1.12 Χρησιμοποιήστε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε μεταφορά υγρού. Κλείστε κάθε σωληνάριο αντίδρασης με το καπάκι του μετά τη χρήση και απορρίψτε το αμέσως μαζί με τυχόν υπολείμματα περιεχομένου σε κλινικό περιέκτη απορριμμάτων με δυνατότητα σφράγισης. Τα μη χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια δεν μπορούν να φυλαχθούν για να χρησιμοποιηθούν αργότερα.
- 1.13 Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διανομή με πιπέτα από το Σωληνάριο 4 (θετικός μάρτυρας DNA) για να διασφαλιστεί πως δεν επιμολύνετε κανένα άλλο σωληνάριο αντίδρασης. Ο κίνδυνος διασταυρούμενης μόλυνσης μπορεί να μειωθεί εάν κλείνετε τα καπάκια των άλλων σωληναρίων αντίδρασης προτού ανοίξετε το Σωληνάριο 4.
- 1.14 Βεβαιωθείτε πως όλα τα καπάκια σωληναρίων αντίδρασης έχουν κλειστεί με ασφάλεια και κατόπιν επισημάνετε κάθε καπάκι με χρήση ανεξίτηλου μαρκαδόρου π.χ. POS για το θετικό μάρτυρα, NEG για τον αρνητικό μάρτυρα και το αναγνωριστικό ασθενούς (ID) για τα δείγματα ασθενών. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάκια αντίδρασης για 10 δευτερόλεπτα με χρήση της ειδικά προσαρμοσμένης μίνι φυγόκεντρου. Επιβεβαιώστε οπτικά την απουσία φυσαλίδων στα μείγματα αντίδρασης.
- 1.15 Προχωρήστε στην Ενότητα 2 αμέσως. Οι αντιδράσεις MycAssay™ Pneumocystis είναι σταθερές στον πάγκο για έως και 60 λεπτά.
- 1.16 Μετά την προετοιμασία της PCR βεβαιωθείτε ότι η περιοχή εργασίας έχει καθαριστεί επιμελώς με χρήση αντιδραστηρίων απολύμανσης DNA.

2. Διεξαγωγή της εκτέλεσης

Προτού συνεχίσετε στην επόμενη ενότητα, παρακαλείστε να ελέγξετε την έκδοση του λογισμικού Dx που έχετε εγκαταστήσει στον υπολογιστή σας. Ανοίξτε το λογισμικό, επιλέξτε **Help** (Βοήθεια) από τη γραμμή εργαλείων και κάντε κλικ στο **About** (Σχετικά).

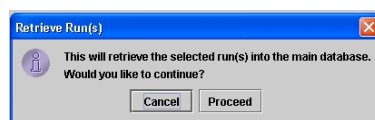
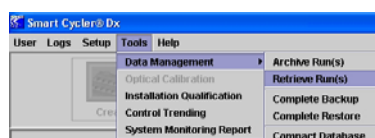
Για την έκδοση λογισμικού 1.7b, ακολουθήστε τις οδηγίες στην Ενότητα 2.1.

Για την έκδοση λογισμικού 3.0, ακολουθήστε τις οδηγίες στην Ενότητα 2.2.

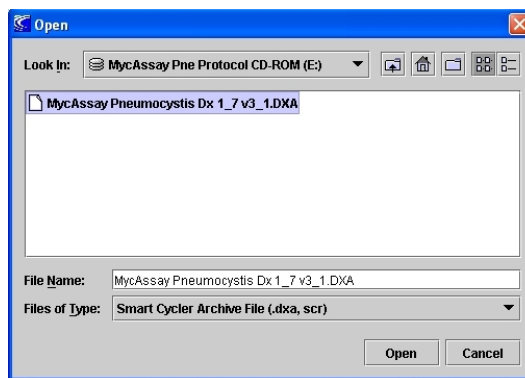
Παρακαλείστε επίσης να λάβετε υπόψη σας πως απαιτούνται ορισμένα δικαιώματα χρήστη στο λογισμικό για τα **Retrieve Run(s)** (Ανάκτηση εκτέλεσης/-ων) ή **Import** (Εισαγωγή) ενός προσδιορισμού. Αυτά τα δικαιώματα μπορούν να ανατεθούν μόνο από τον **Administrator** (Διαχειριστή) του οργάνου.

2.1 Έκδοση 1.7b διαγνωστικού λογισμικού SmartCycler® Dx

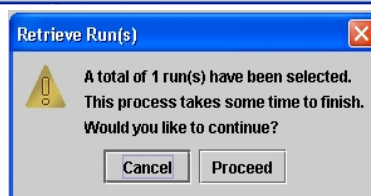
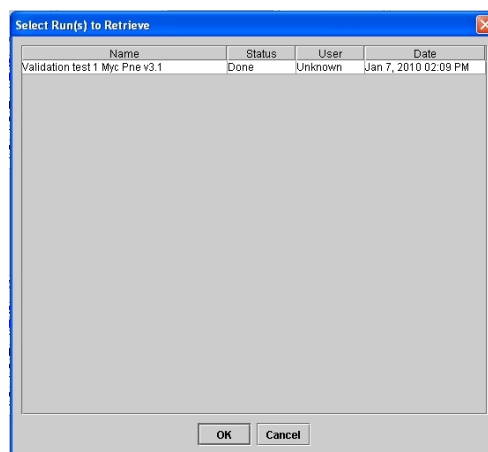
- 2.1.1 Ανοίξτε την έκδοση 1.7b του διαγνωστικού λογισμικού SmartCycler® Dx και εισάγετε το όνομα χρήστη και τον κωδικό πρόσβασής σας.
- 2.1.2 Τοποθετήστε το δίσκο **MycAssay Pneumocystis Myconostica Protocol CD-ROM** και κάντε κλικ στην καρτέλα **Define Assays** (Καθορισμός προσδιορισμών).
- 2.1.3 Μεταβείτε στο **Retrieve Run(s)** (Ανάκτηση εκτέλεσης/-ων) μέσω του καταλόγου **Tools** (Εργαλεία) στην επάνω γραμμή μενού και κάντε κλικ στο **Proceed** (Συνέχιση):



- 2.1.4 Επιλέξτε το αρχείο **MycAssay Pneumocystis Dx1_7 v3_1.DXA** από το δίσκο CD-ROM, όπως φαίνεται παρακάτω. Αυτό το αρχείο θα πρέπει να είναι το μόνο που το λογισμικό αναγνωρίζει (ακολουθεί ένα παράδειγμα):



- 2.1.5 Στην επόμενη οθόνη, επισημάνετε το όνομα αρχείου **Validation test 1 Myc Pnc v3.1** και κάντε κλικ στο **OK**, κατόπιν στο **Proceed** (Συνέχιση) και τέλος στο **OK**:



- 2.1.6 Κλείστε το λογισμικό. Όταν το ξαναοίξετε, ο προσδιορισμός **MycAssay Pneumocystis Dx1.7b v3.1** θα είναι διαθέσιμος για χρήση κατά τη δημιουργία μίας νέας εκτέλεσης.
- 2.1.7 Κάντε κλικ στην καρτέλα **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης). Εισάγετε ένα κατάλληλο **Run Name** (Όνομα εκτέλεσης) (συνιστάται να περιλαμβάνει τουλάχιστον την ημερομηνία και τα αρχικά του χειριστή), η αφήστε το κενό εάν επιθυμείτε να δημιουργηθεί αυτομάτως το όνομα από το λογισμικό.
- 2.1.8 Ως προσδιορισμό επιλέξτε το **MycAssay Pneumocystis Dx1.7 v3.1**.
- 2.1.9 Εισαγάγετε το **Lot Number** (Αριθμός παρτίδας) και το **Expiration Date** (Ημερομηνία λήξης) του κιτ, όπως αυτά αναγράφονται στο κουτί του κιτ και σε κάθε κυψέλη. Ο αριθμός παρτίδας θα αναγράφεται με τη μορφή M-XXXXXXX.
- 2.1.10 Εισάγετε το **Number of specimens** (Αριθμός δειγμάτων) στο πλαίσιο και κάντε κλικ στο **Apply** (Εφαρμογή). Το **Sample ID** (Αναγνωριστικό δείγματος) για κάθε δείγμα θα ονομαστεί αυτομάτως **SPEC** από το λογισμικό. Για το λόγο αυτό, μετονομάστε σωστά κάθε θέση για λόγους ταυτοποίησης, κάντε δηλαδή διπλό κλικ στο **SPEC** για να το επισημάνετε και πληκτρολογήστε κατόπιν το ID δείγματος.
- 2.1.11 Το λογισμικό θα συμπεριλάβει αυτόματος έναν Αρνητικό και έναν Θετικό μάρτυρα στην εκτέλεση PCR Πραγματικού χρόνου.
- 2.1.12 Τοποθετήστε προσεκτικά τα σωληνάρια αντίδρασης στις προκαθορισμένες θέσεις του μπλοκ του SmartCycler® και κάντε κλικ στο **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης). **Προσέχετε** κατά την τοποθέτηση των σωληναρίων αντίδρασης στις προκαθορισμένες θέσεις διότι ενδέχεται να μην έχουν την ίδια σειρά όπως και στην προετοιμασία σας.

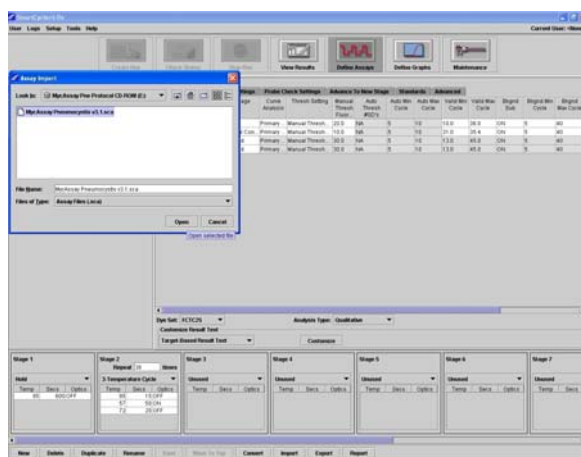
Σημειώστε το όνομα της εκτέλεσης και κάντε κλικ στο **OK**. Τώρα θα ξεκινήσει η εκτέλεση και κόκκινα φωτάκια θα εμφανιστούν πάνω από κάθε θέση που χρησιμοποιείται στο μπλοκ.

Για να ενημερωθείτε σχετικά με το χρόνο έως την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, κάντε κλικ στην καρτέλα **Check Status** (Έλεγχος κατάστασης). Θα προβληθούν το όνομα της εκτέλεσης και ακολούθως ο χρόνος εκτέλεσης.

2.2 Έκδοση 3.0 διαγνωστικού λογισμικού SmartCycler® Dx

2.2.1 Ανοίξτε την έκδοση 3.0 του διαγνωστικού λογισμικού SmartCycler® Dx και εισάγετε το όνομα χρήστη και τον κωδικό πρόσβασής σας.

2.2.2 Εισάγετε το δίσκο **MycAssay Pneumocystis Myconostica Protocol CD-ROM**, κάντε κλικ στην καρτέλα **Define Assays** (Καθορισμός προσδιορισμών) και κάντε **Import** (Εισαγωγή) του αρχείου **MycAssay Pneumocystis v3_1.sca** από το δίσκο CD-ROM, σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:



2.2.3 Κάντε κλικ στην καρτέλα **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης). Εισάγετε ένα κατάλληλο **Run Name** (Όνομα εκτέλεσης) (συνιστάται να περιλαμβάνει τουλάχιστον την ημερομηνία και τα αρχικά του χειριστή), ή αφήστε το κενό εάν επιθυμείτε να δημιουργηθεί αυτομάτως το όνομα από το λογισμικό.

2.2.4 Ως προσδιορισμό επιλέξτε το **MycAssay Pneumocystis v3.1**.

2.2.5 Εισαγάγετε το **Lot Number** (Αριθμός παρτίδας) και το **Expiration Date** (Ημερομηνία λήξης) του κιτ, όπως αυτά αναγράφονται στο κουτί του κιτ και σε κάθε κυψέλη. Ο αριθμός παρτίδας θα αναγράφεται με τη μορφή M-XXXXXXX.

2.2.6 Εισάγετε το **Patient (Sample) ID** (Αναγνωριστικό δείγματος ασθενούς) και το **Number of specimens** (Αριθμός δειγμάτων)(αντίγραφα) στα ενδεδειγμένα πλαίσια και κάντε κλικ στο **Apply** (Εφαρμογή). Κάντε το αυτό για όλα τα δείγματα ασθενών που θα ελεγχθούν. Το λογισμικό θα συμπεριλάβει αυτομάτως έναν Αρνητικό και έναν Θετικό μάρτυρα στην εκτέλεση PCR Πραγματικού χρόνου.

2.2.7 Τοποθετήστε προσεκτικά τα σωληνάρια αντίδρασης στις προκαθορισμένες θέσεις του μπλοκ του SmartCycler® και κάντε κλικ στο **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης). **Προσέχετε** κατά την τοποθέτηση των σωληναρίων αντίδρασης στις προκαθορισμένες θέσεις διότι ενδέχεται να μην έχουν την ίδια σειρά όπως και στην προετοιμασία σας. Σημειώστε το όνομα της εκτέλεσης και κάντε κλικ στο **OK**. Τώρα θα ξεκινήσει η εκτέλεση και κόκκινα φωτάκια θα εμφανιστούν πάνω από κάθε θέση που χρησιμοποιείται στο μπλοκ.

Για να ενημερωθείτε σχετικά με το χρόνο έως την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, κάντε κλικ στην καρτέλα **Check Status** (Έλεγχος κατάστασης). Θα προβληθούν το όνομα της εκτέλεσης και ακολούθως ο χρόνος εκτέλεσης.

3. Ανάλυση και ερμηνεία δεδομένων

- 3.1 Τα αποτελέσματα μπορούν να προβληθούν στο λογισμικό Dx, επιλέγοντας την καρτέλα **View Results** (Προβολή αποτελεσμάτων).
- 3.2 Κάντε κλικ στο κουμπί **View Another Run** (Προβολή άλλης εκτέλεσης) στο κάτω μέρος της σελίδας, επιλέξτε την εκτέλεση που θέλετε να προβάλετε και κάντε κλικ στο **OK**.
- 3.3 Τα **Patient Results** (Αποτελέσματα ασθενούς) θα πρέπει να έχουν ήδη επιλεγεί από τη λίστα **Views** (Προβολές). Το αναγνωριστικό ασθενούς (δείγματος) και ο σχετικός προσδιορισμός θα παρατεθούν με σαφήνεια. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήστε τον παρακάτω πίνακα:

Έκβαση	Αποτέλεσμα ασθενούς	Χρώμα	Ερμηνεία	Περαιτέρω ενέργεια
1	Negative	Πράσινο	Αρνητικό για <i>Pneumocystis</i>	Αναφορά αποτελέσματος
2	Positive	Κόκκινο	Θετικό για <i>Pneumocystis</i>	Αναφορά αποτελέσματος
3	Invalid	Ανοικτό γκρι*	Αστοχία IAC στο δείγμα	Επαναλάβετε το δείγμα
4	Invalid	Ανοικτό γκρι*	Αστοχία στο Θετικό ή στον Αρνητικό μάρτυρα	Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση

*Εάν το αποτέλεσμα έχει αναφερθεί ως ND, σε ανοικτό γκρι χρώμα, πρόκειται για τον κωδικό σφάλματος 3079, το αποτέλεσμα δηλ. υψηλού φθορισμού σε ένα ή περισσότερα κανάλια. Εάν καταγραφεί τιμή Ct $\leq 39,0$ στο κανάλι *Pneumocystis*, η αναφορά είναι θετική.

- 3.4 Για να προβάλετε αποτελέσματα δειγμάτων (τιμές Ct) χωριστά για *Pneumocystis* ή IAC, επιλέξτε **Sample Results** (Αποτελέσματα δειγμάτων) από τη λίστα **Views** (Προβολές) και κάντε κλικ στις επιμέρους καρτέλες για κάθε στόχο (δηλ. **<Pne>** ή **<IAC>**). Τα αποτελέσματα θα προβληθούν με την ίδια μορφή όπως και στα **Patient Results** (Αποτελέσματα ασθενών), αλλά για κάθε επιμέρους στόχο.
- 3.5 Εάν σε ένα δείγμα ασθενούς αναφερθεί αποτέλεσμα Invalid (Άκυρο), πρόκειται για αποτέλεσμα αστοχίας του IAC (επισημαίνεται με το Unresolved (Μη επιλυμένο) στην καρτέλα **Sample Results** (Αποτελέσματα δειγμάτων). Επαναλάβετε την αντίδραση (καθώς και το Θετικό και Αρνητικό μάρτυρα). Εάν η αντίδραση συνεχίσει να αποτυγχάνει, ενδέχεται να υπάρχει ανασταλτική ουσία στη μήτρα και το αποτέλεσμα Negative (Αρνητικό) δεν είναι αξιόπιστο.
- 3.6 Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή Ct, τόσο μεγαλώνει η πιθανότητα της νόσου. Οι τιμές Ct που βρίσκονται κοντά στην τιμή αποκοπής (cut-off) 39,0 είναι περισσότερο πιθανό να αντιπροσωπεύουν εποικισμό και όχι λοίμωξη. Ορισμένοι ασθενείς ενδέχεται ωστόσο να νοσήσουν με παρουσία πολύ μικρών ποσοτήτων *P. jirovecii*, λόγω ανεπαρκούς δείγματος, προηγούμενης θεραπείας ή της φύσης του μυκητιακού φορτίου στο συγκεκριμένο ασθενή.
- 3.7 Για την εξαγωγή δεδομένων της εκτέλεσης με σκοπό τη μεταφορά σε άλλον υπολογιστή, μεταβείτε στον κατάλογο **Tools** (Εργαλεία) στο πάνω μέρος της οθόνης, επιλέξτε **Data Management** (Διαχείριση δεδομένων) και κατόπιν **Archive Run(s)** (Αρχειοθέτηση εκτέλεσης/-ων) από την πτυσσόμενη λίστα. Στην οθόνη μηνύματος που θα εμφανιστεί, κάντε κλικ στο **Proceed** (Συνέχιση). Επιλέξτε την εκτέλεση που θέλετε να αρχειοθετήσετε, τσεκάροντας το πλαίσιο στα αριστερά και κάντε κλικ στο **OK**. Θα εμφανιστεί ένα μήνυμα προειδοποίησης αναφέροντας τον αριθμό των εκτελέσεων που θα αρχειοθετηθούν. Εάν ο αριθμός είναι σωστός, κάντε κλικ στο **Proceed** (Συνέχιση). Επιλέξτε τον προορισμό αποθήκευσης του αρχείου εκτέλεσης, π.χ. στικάκι μνήμης USB. Κάντε κλικ στο **Save** (Αποθήκευση) και σημειώστε τον αριθμό του αρχείου. Θα εμφανιστεί μία οθόνη μηνύματος αναφέροντας τον αριθμό των εκτελέσεων που θα αρχειοθετηθούν. Εάν ο αριθμός είναι σωστός, κάντε κλικ στο **Proceed** (Συνέχιση).
- 3.8 Για την εισαγωγή δεδομένων εκτέλεσης, μεταβείτε στον κατάλογο **Tools** (Εργαλεία) στο πάνω μέρος της οθόνης, επιλέξτε **Data Management** (Διαχείριση δεδομένων) και κατόπιν **Archive Run(s)** (Αρχειοθέτηση εκτέλεσης/-ων) από την πτυσσόμενη λίστα. Στην οθόνη μηνύματος που θα εμφανιστεί, κάντε κλικ στο **Proceed** (Συνέχιση). Μεταβείτε στο **Look In** (Διερεύνηση σε): και επιλέξτε τη συσκευή αποθήκευσης που χρησιμοποιήθηκε για την αρχειοθέτηση των δεδομένων της εκτέλεσης (βλ. ενότητα 3.4 παραπάνω). Επιλέξτε το αρχείο εκτέλεσης που θέλετε να ανακτήσετε και κάντε κλικ στο **Open** (Ανοιγμα). Θα εμφανιστεί μια καινούργια οθόνη που θα σας προτρέψει να επιλέξετε την εκτέλεση που θέλετε να ανακτήσετε. Επιλέξτε την εκτέλεση που θέλετε να ανακτήσετε και κάντε κλικ στο **OK**. Θα εμφανιστεί μία οθόνη μηνύματος αναφέροντας τον αριθμό των εκτελέσεων που θα ανακτηθούν. Εάν ο αριθμός είναι σωστός, κάντε κλικ στο **Proceed** (Συνέχιση).
- 3.9 Μόλις ολοκληρωθεί μία εκτέλεση, το αρχείο δεδομένων της θα μεταφερθεί αυτόματα στο **Folder** (Φάκελο) **SmartCycler Dx** στην επιφάνεια εργασίας. Αυτό το αρχείο μπορεί να αντιγραφεί σε οποιοδήποτε φάκελο και να αποθηκευτεί ηλεκτρονικά, εάν χρειάζεται.
- 3.10 Εάν απαιτείται επιπλέον και έκτυπο των αποτελεσμάτων, κάντε κλικ στο **Report** (Αναφορά) και **Print** (Εκτύπωση). Το έκτυπο θα συμπεριλάβει τόσο το γενικό **Patient result** (Αποτέλεσμα ασθενούς) (Positive, Negative ή Invalid) και την τιμή Ct για κάθε **Sample Result** (Αποτέλεσμα δείγματος).

4. Επίλυση προβλημάτων

4.1 Ο Αρνητικός μάρτυρας παρήγαγε θετικό σήμα στο κανάλι FAM:

- Συνέβη επιμόλυνση κατά την προετοιμασία.. Κανένα αποτέλεσμα ολόκληρης της εκτέλεσης δεν μπορεί να θεωρηθεί ακριβές.
- Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση, προσέχοντας ιδιαίτερα κατά την προσθήκη των μητρών και ιδιαίτερα του Θετικού μάρτυρα (Σωληνάριο 4), για να βεβαιωθείτε πως δεν συμβαίνει διασταυρούμενη μόλυνση.
- Βεβαιωθείτε πως η περιοχή εργασίας και τα όργανα έχουν απολυμανθεί σωστά πριν και μετά τη χρήση.
- Ο Αρνητικός μάρτυρας τοποθετήθηκε λανθασμένα στο όργανο.
- Προσέξτε ώστε τα σωληνάρια αντίδρασης να τοποθετούνται στις προκαθορισμένες θέσεις τους και ότι επισημαίνονται σωστά μέσα από το λογισμικό.

4.2 Η τιμή Ct IAC του Αρνητικού μάρτυρα δεν βρίσκεται εντός του αποδεκτού εύρους:

- Η PCR έχει ανασταλεί.
- Προτού ξεκινήσετε την προετοιμασία της PCR, βεβαιωθείτε πως η περιοχή εργασίας και τα όργανα είναι απολύτως στεγνά μετά τη χρήση των μέσων απολύμανσης.
- Οι συνθήκες φύλαξης του kit δεν συμμορφώθηκαν με τις οδηγίες στην ενότητα Φύλαξη αυτών των Οδηγιών χρήσης ή έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης του kit.
- Παρακαλείστε να ελέγξετε εάν τηρήθηκαν οι ενδεδειγμένες συνθήκες φύλαξης του kit. Ελέγξτε την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων (βλ. κουτί του kit / ετικέτα κυψέλης) και επαναλάβετε, εάν είναι απαραίτητο, με kit που δεν έχει λήξει.
- Στην αντίδραση PCR δεν προστέθηκε το αντιδραστήριο του Σωληναρίου 1 ή το αντιδραστήριο του Σωληναρίου 2 ή προστέθηκε διπλή ποσότητα του Σωληναρίου 2.
- Επαναλάβετε την εκτέλεση προσέχοντας το στάδιο της προετοιμασίας. Αυτού του είδους τα σφάλματα μπορούν να ανιχνευθούν εάν ένα σωληνάριο έχει υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα υγρού από τα υπόλοιπα.

4.3 Ο Θετικός μάρτυρας είναι αρνητικός:

- Οι συνθήκες φύλαξης του kit δεν συμμορφώθηκαν με τις οδηγίες στην ενότητα Φύλαξη αυτών των Οδηγιών χρήσης ή έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης του kit.
- Παρακαλείστε να ελέγξετε εάν τηρήθηκαν οι ενδεδειγμένες συνθήκες φύλαξης του kit. Ελέγξτε την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων (βλ. κουτί του kit / ετικέτα κυψέλης) και επαναλάβετε με kit που δεν έχει λήξει, εάν είναι αναγκαίο.
- Συνέβη σφάλμα κατά το βήμα 1.12 και η μήτρα του Θετικού μάρτυρα (Σωληνάριο 4) τοποθετήθηκε σε λάθος σωληνάριο αντίδρασης.
- Επαναλάβετε την εκτέλεση, προσέχοντας ιδιαίτερα το στάδιο της προετοιμασίας. Τέτοια σφάλματα ανιχνεύονται με τη διαπίστωση υψηλότερου επιπέδου υγρού σε μία αντίδραση και χαμηλότερου σε άλλη, σε σύγκριση με το φυσιολογικό.
- Στην αντίδραση δεν προστέθηκε αντιδραστήριο του Σωληναρίου 1 ή του Σωληναρίου 2.
- Επαναλάβετε την εκτέλεση προσέχοντας το στάδιο της προετοιμασίας. Τέτοια σφάλματα ανιχνεύονται με τη διαπίστωση χαμηλότερων επιπέδων υγρού σε μία αντίδραση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες.
- Ο Θετικός μάρτυρας τοποθετήθηκε με λανθασμένο τρόπο στο όργανο.
- Προσέξτε ώστε τα σωληνάρια αντίδρασης να τοποθετούνται στις προκαθορισμένες θέσεις τους και ότι επισημαίνονται σωστά μέσα από το λογισμικό.

4.4 Το δείγμα /-τα ασθενούς δίνουν την Έκβαση 3 - "Invalid":

- Πιθανώς το απομονωμένο κλινικό δείγμα /-τα περιέχει/-ουν αναστολείς PCR.
- Συνιστούμε την απομόνωση DNA από κλινικά δείγματα με το kit Απομόνωσης μυκητιακού DNA MycXtra™.

4.5 Δεν υπάρχουν αποτελέσματα από κανένα κανάλι για κανένα δείγμα ή μάρτυρα:

- Οι συνθήκες φύλαξης του kit δεν συμμορφώθηκαν με τις οδηγίες στην ενότητα Φύλαξη αυτών των Οδηγιών χρήσης ή έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης του kit.
- Παρακαλείστε να ελέγξετε εάν τηρήθηκαν οι ενδεδειγμένες συνθήκες φύλαξης του kit. Ελέγξτε την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων (βλ. κουτί του kit / ετικέτα κυψέλης) και επαναλάβετε με kit που δεν έχει λήξει, εάν είναι αναγκαίο.
- Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε δεν λειτουργεί ιδανικά.
- Παρακαλείστε να ελέγξετε πως το όργανο PCR Πραγματικού χρόνου έχει ενημερωμένο βιβλίο συντήρησης και έχει βαθμονομηθεί πλήρως όπως περιγράφεται στον Οδηγό Εγκατάστασης και Συντήρησης.
- Χρησιμοποιήθηκε λανθασμένο αρχείο πρωτοκόλλου κατά τη ρύθμιση παραμέτρων του λογισμικού.
- Παρακαλείστε να ανατρέξετε στην Ενότητα 2 και να επιλέξετε το σωστό αρχείο Πρωτοκόλλου, όπως καθορίζεται για κάθε τύπο/έκδοση λογισμικού από το δίσκο CD ROM Πρωτοκόλλου της Myconostica Μπορεί να φορτωθεί μόνο το ενδεδειγμένο αρχείο για το λογισμικό. Επαναλάβετε την εκτέλεση με χρήση του σωστού αρχείου πρωτοκόλλου

Εάν έχετε περαιτέρω ερωτήσεις ή αντιμετωπίσετε προβλήματα, παρακαλείστε να επικοινωνήσετε με την Τεχνική Υποστήριξη (mycotech@myconostica.co.uk)

Χαρακτηριστικά απόδοσης και περιορισμοί

Αναλυτική ευαισθησία

Χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω και ανασυνδυασμένο μόριο DNA, που παρήχθη στη *Mycopostica*, το Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection - LoD) για την *Pneumocystis* καθορίστηκε ότι είναι < 35 αντίγραφα. Αυτή η τιμή προσδιορίστηκε με χρήση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου DNA που περιέχει την ακολουθία - στόχο. Η ακολουθία-στόχος της *Pneumocystis* είναι μιτοχονδριακή, και επομένως υπάρχουν πολυάριθμα αντίγραφα σε κάθε κύτταρο, ο ακριβής αριθμός δεν είναι ωστόσο γνωστός.

Αναλυτική επιλεκτικότητα

Η αναλυτική επιλεκτικότητα ελέγχθηκε με χρήση DNA απομονωμένου από διάφορα μυκητιακά και μη-μυκητιακά είδη. Τα ακόλουθα είδη δεν παρήγαγαν θετικό αποτέλεσμα

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*, *Rhodotomila rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon capitatum*. Τα ακόλουθα βακτηριακά είδη δεν ανέφεραν θετικό αποτέλεσμα: *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*.

Το ανθρωπινό γονιδιωματικό DNA δεν επιφέρει θετικό αποτέλεσμα σε αυτόν τον προσδιορισμό.

Ουσίες παρεμβολής (αντενδείξεις χρήσης)

Οι ακόλουθες ενώσεις ελέγχθηκαν σε κλινικά σημαντικές συγκεντρώσεις και δεν βρέθηκε να αναστέλλουν τον προσδιορισμό: ακετυλοκυστεΐνη, αμφοτερικίνη, βεκλομεθαζόνη διπρωπιονικό άλας, βουδεσονίδη, χλωριούχος κολιστίνη, προπιονική φλουτικαζόνη, άνυδρη φουμαρική φορμοτερόλη, βρωμιούχο ιπρατρόπιο, λιδοκαΐνη, μαννιτόλη, θειική σαλβουταμόλη, σαλμερτερόλη, Sertrin (τριμεθοπρίμη & σουλφαμεθοξαζόλη), χλωριούχο νάτριο, νατριούχο άλας χρωμογλυκίνης, τερβουταλίνη, τοβραμυκίνη.

Αξιολόγηση απόδοσης

Η κλινική αποκοπή σε τιμή Ct 39,0 καθορίστηκε μετά από ανάλυση μίας ομάδας κλινικών δειγμάτων προερχόμενων από διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών.

Δείγματα της αναπνευστικής οδού (βρογχοπνευμονική έκπλυση-BAL) που είχαν συλλεγεί από 2 νοσοκομεία, απομονώθηκαν με το kit MycXtra®, και αποθηκεύτηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της απόδοσης του MycAssay™ Pneumocystis με κλινικά δείγματα. Έγιναν συγκρίσεις των αποτελεσμάτων της PCR με τη μικροσκοπική μέθοδο ανοσοφθορισμού.

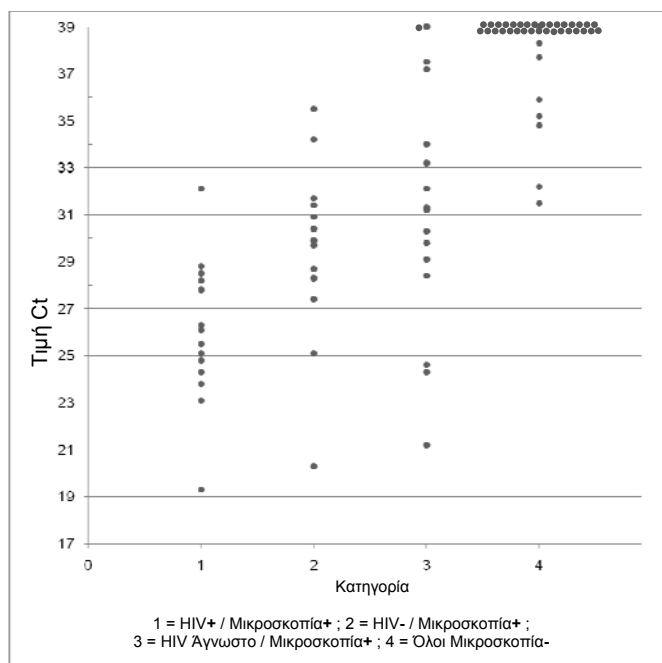
PCR έναντι Μικροσκοπικής διάγνωσης

	Θετική μικροσκοπία	Αρνητική μικροσκοπία		
Θετική PCR	45	8	0.85	PPV
Αρνητική PCR	2	33	0.94	NPV
	0.96	0.80		
	Ευαισθησία	Ειδικότητα		

Πίνακας 1: Διαγνωστική ειδικότητα και ευαισθησία του kit MycAssay™ Pneumocystis σε σύγκριση με τη μικροσκοπική μέθοδο ανοσοφθορισμού.

Στον Πίνακα 1 αναπαριστώνται δεδομένα προερχόμενα από ασθενείς με διαγεγνωσμένη προσβολή από HIV, ασθενείς που δεν έχουν προσβληθεί από HIV και ασθενείς για τους οποίους δεν είναι γνωστό εάν έχουν προσβληθεί από HIV. Οι ασθενείς με πνευμονία *Pneumocystis* διαφέρουν σημαντικά ως προς τις ανιχνεύσιμες ποσότητες του οργανισμού. Όσο χαμηλότερη η τιμή Ct, τόσο υψηλότερη η πιθανότητα νόσου. Ασθενείς με HIV και πνευμονία από *Pneumocystis* τείνουν να έχουν υψηλότερους αριθμούς ανιχνεύσιμων οργανισμών από ασθενείς που δεν έχουν προσβληθεί από τον ιό,

υπάρχει ωστόσο σημαντική αλληλοεπικάλυψη. Το διάγραμμα διασποράς στο Σχήμα 1 παρουσιάζει αυτήν την αλληλοεπικάλυψη. Για λόγους πληρότητας, λόγω του ότου η ομάδα δεδομένων του Πίνακα 1 περιελάμβανε ασθενείς για τους οποίους δεν είναι γνωστό εάν έχουν προσβληθεί από HIV, αυτή η ομάδα περιλαμβάνεται στο Σχήμα 1 (στήλη 3):



Σχήμα 1: Διάγραμμα διασποράς τιμών Ct ληφθέντων από DNA απομονωμένο από δείγματα της αναπνευστικής οδού ασθενών. Περιγράφονται τέσσερις ομάδες.

Κλινική αναφορά

Το kit MycAssay™ Pneumocystis προορίζεται για χρήση ως διαγνωστικό βοήθημα στη διάγνωση της πνευμονίας από *Pneumocystis*. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογηθούν στο πλαίσιο της κλινικής κατάστασης του ασθενούς και των αποτελεσμάτων άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.

Ακολουθούν συνιστώμενες αναφορές, κάθε μία από τις οποίες εξαρτάται από την ερμηνεία του αποτελέσματος του προσδιορισμού:

Έκβαση No 1

“Δεν ανιχνεύτηκε *Pneumocystis jirovecii*.”

Έκβαση No 2

“Ανιχνεύτηκε *Pneumocystis jirovecii*.” Θετικό αποτέλεσμα. Αναφέρετε τιμή Ct”

Έκβαση No 3

“Η δοκιμασία απέτυχε – παρουσία αναστολέων ή άλλης άγνωστης ουσίας”

Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή Ct, τόσο μεγαλώνει η πιθανότητα της νόσου. Οι τιμές Ct που βρίσκονται κοντά στην τιμή αποκοπής (cut-off) 39,0 είναι περισσότερο πιθανό να αντιπροσωπεύουν εποικισμό και όχι λοίμωξη. Ορισμένοι ασθενείς ενδέχεται ωστόσο να νοσούν με παρουσία πολύ μικρών ποσοτήτων *P. jirovecii*, λόγω ανεπαρκούς δείγματος, προηγούμενης θεραπείας ή της φύσης του μυκητιακού φορτίου στο συγκεκριμένο ασθενή.

Περιορισμοί της διαδικασίας

- Ο κύριος περιορισμός της διαδικασίας σχετίζεται με την ποιότητα του κύριου δείγματος:
 - Εάν το δείγμα είναι πολύ μικρό ή δεν έχει συλλεγεί από την προσβεβλημένη περιοχή του πνεύμονα, ο έλεγχος θα είναι λιγότερο ευαίσθητος και ενδέχεται να είναι ψευδώς αρνητικός.
 - Τα δείγματα βρογχοπνευμονικής έκπλυσης θα πρέπει να φυγοκεντρώνονται πριν από την απομόνωση του DNA από το σφαιρίδιο.
 - Τα δεδομένα έδειξαν επίσης ότι μία μείωση στον όγκο του υπερκείμενου που χρησιμοποιείται στη διαδικασία απομόνωσης και επιτυγχάνεται στο στάδιο της φυγοκέντρωσης, μειώνει την αναλογία αναστολέων που εισέρχονται στο σύστημα.
- Η διαδικασία απομόνωσης μυκητιακού DNA MycXtra™ έχει σχεδιαστεί για να αφαιρεί αναστολές PCR, δεν έχουν ωστόσο αξιολογηθεί όλα τα φάρμακα ή όλοι οι πληθυσμοί ασθενών.
- Η διαδικασία δεν έχει αξιολογηθεί πλήρως με πτύελα ούτε έχει αξιολογηθεί με επαχθέν αλατούχο διάλυμα ή με δείγματα παιδιών.
- Ψευδώς θετικά αποτελέσματα ενδέχεται να προκύψουν από εξωτερική επιμόλυνση του αρχικού δείγματος ή δοκιμασίας. Αυτού του είδους η επιμόλυνση μπορεί επίσης να προέλθει από αέρα επιμολυσμένο με *P. jirovecii*, κακή πειραματική τεχνική ως προς το θετικό μάρτυρα ή εξωτερική (ιδιαίτερα βοηθημάτων διανομής με πιπέτα) επιμόλυνση με DNA από *P. jirovecii*.
- Ορθώς θετικό αποτέλεσμα μπορεί να ληφθεί από ασθενείς με προσωρινό ή μόνιμο εποικισμό με *P. jirovecii*, απαιτείται ωστόσο κλινική αξιολόγηση για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας.

ΑΔΕΙΟΔΟΤΗΣΗ

Το TopTaq™ Hot Start παρέχεται από την QIAGEN. Το QIAGEN® είναι σήμα κατατεθέν της Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία.

Αυτό το προϊόν πωλείται υπό την άδεια του Ινστιτούτου Ερευνών Δημόσιας Υγείας (Public Health Research Institute), Newark, New Jersey, ΗΠΑ και επιτρέπεται να χρησιμοποιείται με τήρηση των δικαιωμάτων ευρεσιτεχνίας PHRI μόνο για διαγνωστικές *in vitro* διαδικασίες σε ανθρώπους.

Το SmartCycler® είναι σήμα κατατεθέν της Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, ΗΠΑ.



Myconostica Limited, South Court, Sharston Road, Sharston,
Manchester, M22 4SN, United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 161 998 7239 Facsimile: +44 (0) 161 902
2496
Email: mycotech@myconostica.co.uk



IVD