

# MycAssay™ Pneumocystis

## Stratagene Mx3000-serien

### 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 Stratagene-instrument i Mx3000-serien, antingen Mx3000P® eller Mx3005P®, tillsammans med MxPro programversion 4.10.

#### 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-sulfametoxazol (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. Stratagenes realtids-PCR-system mäter samtidigt den fluorescens som emitteras av varje beacon.

<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.

## Försiktighetsmått

- Kitet är avsett för *in vitro*-diagnostik.
- 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 rekvideras från Myconostica Ltd.
- Detta test är endast avsett att användas med Stratagene Mx3000-serien med MxPro programversion 4.10.
- **Vid valideringsstudier observerades följande, specifikt för detta instrument;**
  - **Om instrumentet har använts alldeles nyss ska du låta lampan svalna i minst en timme innan du förbereder en MycAssay™ Pneumocystis-körning, annars kan sensitiviteten påverkas vilket leder till falskt negativa resultat.**
  - **Precisionen är lägre vid låga koncentrationer vid och kring den kliniska tröskeln jämfört med andra instrument som vi har testat.**
- 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.
- Åt, 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.
- Detta kit validerades med optiska PCR-rör på 0,2 ml i remsor om 8 st med proppar (Agilent Technologies artikelnr. 401428 och 401425). Om andra källor/plasttyper används kan tröskelvärdena bli ogiltiga, och därmed de påståenden som görs i bruksanvisningen. Det rekommenderas att om en alternativ källa används, lokal validering genomförs med positiva och negativa kontrollreaktioner.

## 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 målsekvensen ( <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> -målsekvensen Tris-HCl-buffert	25 µL

Kitet innehåller även följande:

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

## Förvaring

Kitet ska förvaras nedfryst (–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

- Stratagene Realtids-PCR-system, Mx3000-serien, (inkl. användarhandbok, tillhörande dator och programmet MxPro, version 4.10).
- Optiska PCR-rör i remsor (Agilent Technologies, artikelnr. 401428)
- Proppar till optiska PCR-rör i remsor (Agilent Technologies, artikelnr. 401425)
- 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 märkpena
- 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)
- Adapterplatta till vortexblandare (referensnr. 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 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 rör måste tillslutas efter användning och innan de kastas.
- Var noga med att märka rören på lämpligt sätt om flera prover bearbetas.
- Låt lampan svalna i minst en timme efter en körning innan du förbereder en MycAssay™ Pneumocystis-körning för att minimera antalet falskt negativa resultat. Efter denna avsvältningsperiod behöver lampan en uppvärmningsperiod på 20 minuter, se stycke 1.1 nedan

<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 Stratagene Mx3000-seriens realtids-PCR-systemet (instrument och tillhörande dator) och MxPro 4.10-programmet. Ange användarnamn och lösenord, om det behövs. Lampan behöver en uppvärmningsperiod på 20 minuter. Starta inte körningen förrän lampan är klar.
- 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 prover. Om fler än 6 patientprover 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 laboratoriebanken, 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.
- 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.

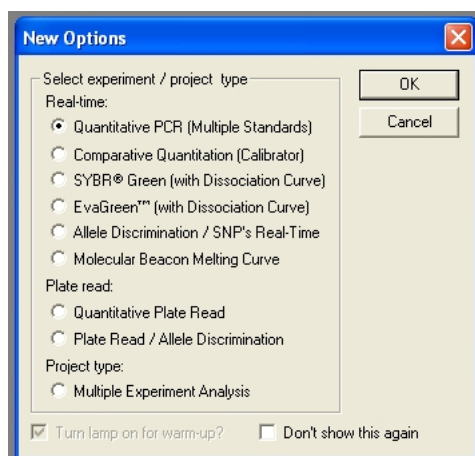
Reagens	Reaktion		
	Negativ kontroll	Patientprov	Positiv kontroll
Rör 1 (orange propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 2 (blå propp)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Rör 3 (genomskinlig propp)	10 µL	-	-
Patientprov	-	10 µL	-
Rör 4 (svart propp)	-	-	10 µL
Totalvolym	25 µL	25 µL	25 µL

- 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.

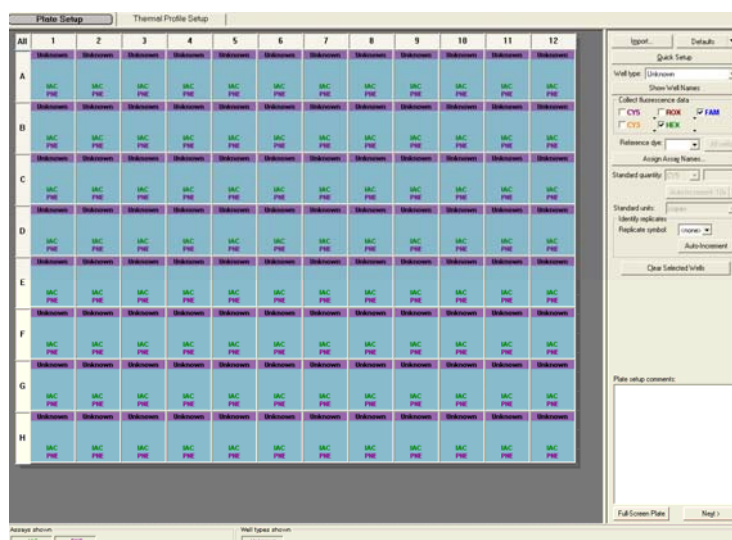
- 1.13 Var extra noga vid pipettering från Rör 4 (positivt kontroll-DNA) så att det inte kontaminerar något annat rör. Stäng locken på övriga rör innan Rör 4 öppnas för att minska risken för överföring av material.
- 1.14 Kontrollera att alla proppar sitter ordentligt i rören. Anteckna platsen för varje prov i remsrören. Märk 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

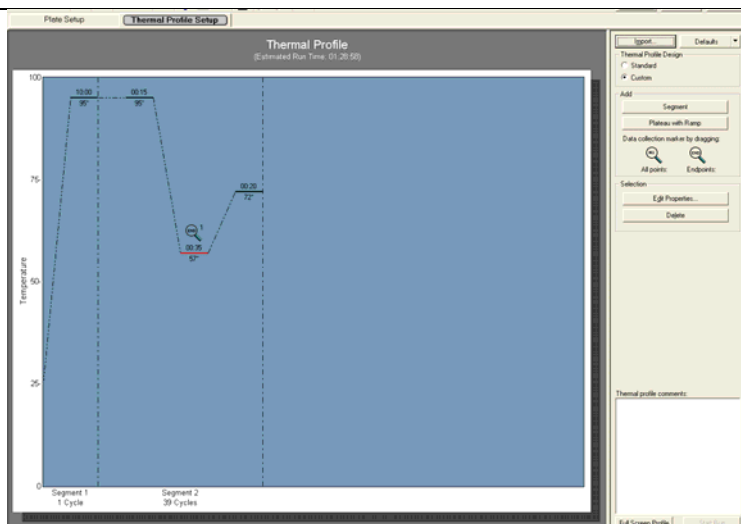
- 2.1 Öppna MxPro-programmet, version 4.10.
- 2.2 Sätt in CD-ROM-skivan MycAssay Pneumocystis Myconostica Protocol.
- 2.3 I menyn **New Options** väljer du det första alternativet: Real Time: Quantitative PCR (Multiple Standards), och klickar på OK, så som visas:



- 2.4 Klicka på knappen **Import** till höger på fliken **Plate Setup**. Välj **MycAssay PNE Myconostica Protocol CD-ROM** i rullgardinslistan vid **Look-In:** och importera sedan filen **MycAssay Pneumocystis v3\_1.mxp**. Klicka på **Finish**. När detta är gjort ska **Plate Setup** se ut som i detta exempel;



- 2.5 Vi rekommenderar att, för de brunnar som är tomma, ställa in **Well Type** på **<blank>** (via rullgardinslistan **Well Type**) för att förhindra att ljusrefraktion från plasten interfererar med signalen från de brunnar som innehåller reaktioner.
- 2.6 Upprepa importprocessen på fliken **Thermal Profile Setup** för att importera PCR-programmet för denna analys. Ställ in **Thermal Profile Design** på **Custom** och kör sedan **Import** av samma fil som i beskrivningen i 2.4. När detta är gjort ska **Thermal Profile Setup** se ut som i detta exempel:



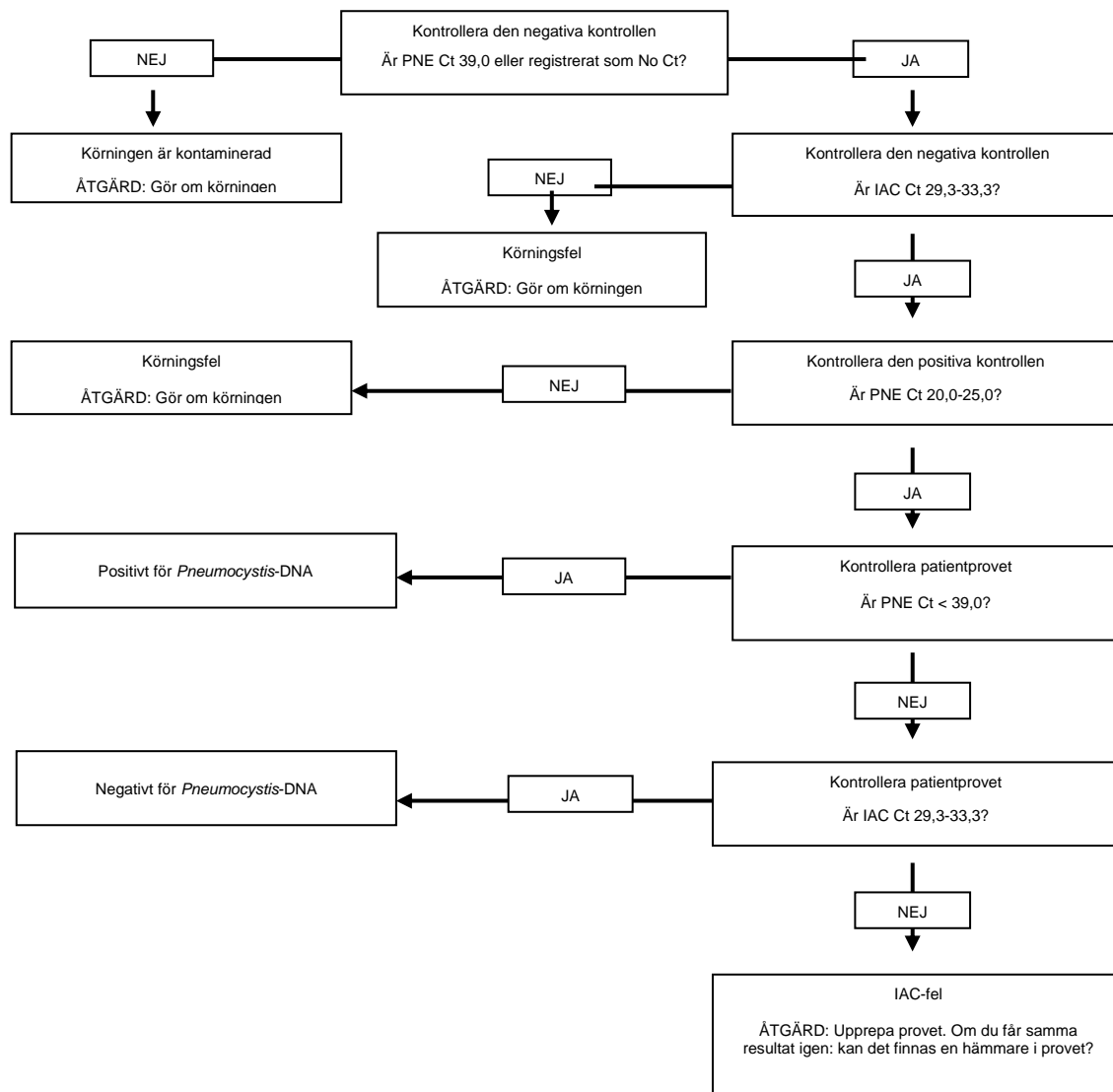
- 2.7 Namnge brunnarna på lämpligt sätt på fliken **Plate Setup**. Högerklicka på en markerad brunn (eller grupp av brunnar vid replikat) och välj **Well Information** i listan med alternativ. Skriv in namnet på det prov som används i den brunnen i sektionen **Name**:
- 2.8 När alla brunnarna har fått lämpliga namn sparar du körningen, ger den ett passende filnamn som innehåller datum och operatörens initialer och startar sedan körningen genom att välja knappen **Run** högst upp till höger på skärmen på fliken **Instrument**. Klicka därefter på knappen **Start** i det nedre högra hörnet.
- 2.9 Kom ihåg att låta instrumentet svalna i minst en timme innan du börjar från moment 1.1 igen.

### 3. Dataanalys och tolkning

- 3.1 Så snart körningen är klar kan du granska resultaten genom att välja knappen **Analysis** högst upp till höger på skärmen, följt av fliken **Results**.
- 3.2 Markera området **Amplification Plots analysis** och ställ in tröskelvärdena för varje kanal på följande sätt, och läs dem genom att klicka på hänglåsikonen:  

$$\text{PNE} = 500$$

$$\text{IAC} = 100$$
- 3.3 **Adaptive Baseline** ska också vara valt, detta är oftast standardinställningen i programmet.
- 3.4 Spara ändringarna. Varje kanal kan granskas för sig genom att klicka i och markera/avmarkera rutorna i sektionen **Assays Shown** till vänster nedtill på skärmen.
- 3.5 Data kan exporteras till Excel för fortsatt bearbetning med **File>Export Text Report>Export Text Report to Excel**. Endast brunnar/färgningar som har markerats blir exporterade, så se till att alla relevanta/erforderliga brunnar/färgningar är valda.
- 3.6 Du kan öppna den sparade .csv-filen med Excel eller liknande kalkylprogram.
- 3.7 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 Undetected	Inom 29,3-33,3	Acceptabel negativ kontroll	Patientresultat tillförlitliga
Negativ kontroll	39,0 eller Undetected	<29,3 eller >33,3	Fel för negativ kontroll	Upprepa hela körningen
Negativ kontroll	<39,0	Inom 29,3-33,3	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
Patient	39,0 eller Undetected	Inom 29,3-33,3	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 Undetected	<29,3 eller >33,3	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 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 rörremssorna satts in åt rätt håll i maskinen.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Tröskelvärdena är endast giltiga om de rekommenderade remsrören och propparna från Agilent Technologies används (artikelnr. 401428 och 401425).

### 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 tillsats 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.
- Tröskelvärdena är endast giltiga om de rekommenderade remsrören och propparna från Agilent Technologies används (artikelnr. 401428 och 401425).

### 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 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 rörremssorna satts in åt rätt håll i maskinen.
- Andra rör eller plattor än de rekommenderade har använts.
- Tröskelvärdena är endast giltiga om de rekommenderade remsrören och propparna från Agilent Technologies används (artikelnr. 401428 och 401425).

### 4.4 Patientprov(er) ger "IAC failure":

- Det är troligt att ett eller flera extraherade patientprover innehåller PCR-inhibitorer.
- Vi rekommenderar att DNA extraheras med kitet MycXtra™ Fungal DNA Extraction.

#### 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.

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

### Data över analytiska prestanda för Mx3000-serien

Kitet validerades ursprungligen med Cepheid SmartCycler®. Vissa av påståendena om analysens prestanda omvaliderades på Mx3005P®-plattformen, med optiska PCR-rör och proppar (Agilent Technologies, artikelnr. 401428 och 401425) och rapporteras nedan.

### 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 <50 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.

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

#### 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*.

Humant genomiskt DNA ger inte positivt resultat i denna analys.

#### Störande ämnen (kontraindikationer mot användning)

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

## Prestandautvärdering

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

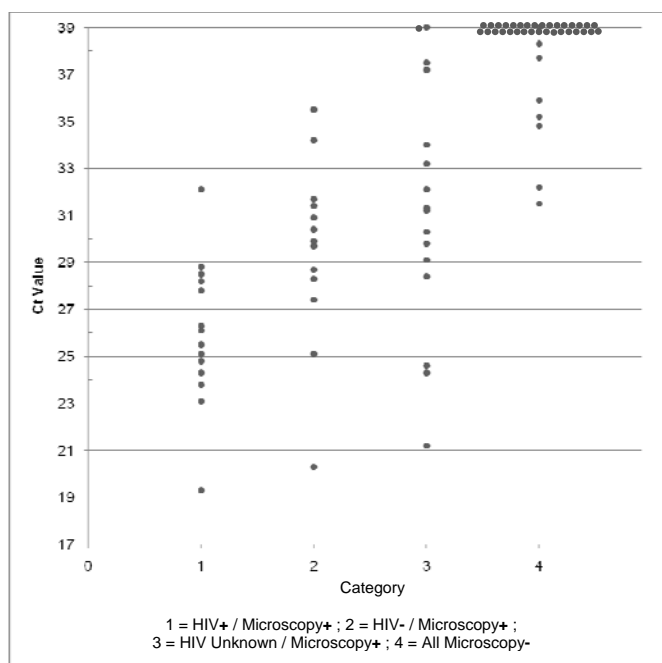
Prover från luftvägar (BAL) som insamlats från 2 sjukhus, extraherats med kitet MycXtra™ och förvarats, användes för att utvärdera kitet MycAssay™ Pneumocystis. PCR-resultaten jämfördes med immunfluorescensmikroskopi.

### 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 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.

## Procedures begränsningar

- Procedures 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.
- Utvärdering av kliniska prestanda har inte bekräftats med MX3005P®-instrumentet.
- 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.

Mx3000P® och Mx3005P® är registrerade varumärken som tillhör Stratagene. MxPro™ är ett varumärke som tillhör Stratagene.

IVD



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

