

MycoReal[®] Kit *Pneumocystis*

Kit Version 1.1

Gebrauchsanweisung



CE

IVD

In vitro-Diagnostikum

REF

DHUF00353

Σ

50 Reaktionen















ingenetix GmbH
Haidingergasse 1
1030 Vienna, Austria
T +43(0)1 36 198 01
office@ingenetix.com
www.ingenetix.com

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Zweckbestimmung..... | 3 |
| 2. Produktbeschreibung..... | 3 |
| 3. Erregerinformation..... | 3 |
| 4. Grundprinzip der real-time PCR..... | 4 |
| 5. Kit Inhalt, Stabilität und Lagerung..... | 4 |
| 6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte..... | 5 |
| 7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise..... | 5 |
| 7.1. Generelle Hinweise..... | 5 |
| 7.2. Spezifische Hinweise..... | 5 |
| 8. Grenzen des Verfahrens..... | 6 |
| 9. Vorbereitung der Proben..... | 7 |
| 9.1. Probeentnahme und Lagerung..... | 7 |
| 9.2. Empfohlene Extraktionsmethoden..... | 7 |
| 9.3. Qualitätskontrolle für DNA-Extraktion und PCR-Inhibition mit IPC..... | 7 |
| 9.3.1. Anwendung der IPC als Kontrolle der Extraktion und real-time PCR..... | 7 |
| 10. Vorbereitung der real-time PCR..... | 8 |
| 10.1. Pipettierschema..... | 8 |
| 10.2. Programmierung des Temperaturprofils..... | 9 |
| 11. Interpretation der Daten..... | 10 |
| 11.1. Kontrollen..... | 10 |
| 11.2. Klinische Proben..... | 11 |
| 12. Troubleshooting..... | 11 |
| 12.1. Kein pathogenspezifisches Signal mit Positivkontrolle und IPC..... | 11 |
| 12.2. Erreger-Signal in der Negativkontrolle..... | 11 |
| 12.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion..... | 11 |
| 12.4. IPC spezifisches Signal mit PCR Negativkontrolle und Positivkontrolle..... | 12 |
| 12.5. Kein Signal mit IPC und kein pathogenspezifisches Signal in Probe..... | 12 |
| 13. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance..... | 13 |
| 13.1. Testperformance..... | 13 |
| 13.2. Nachweisgrenze, LoD95%..... | 14 |
| 13.3. Linearität und dynamischer Messbereich..... | 14 |
| 13.4. Präzision..... | 14 |
| 13.5. Analytische Spezifität..... | 14 |
| 13.6. Diagnostische Evaluierung..... | 15 |
| 14. Literatur..... | 16 |
| 15. Änderungsindex..... | 16 |

Erklärung der Symbole

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |
|  | Katalognummer |  | Hersteller |
|  | Ausreichend für "n" Prüfungen |  | Temperaturgrenzwerte (Aufbewahrung bei) |
|  | Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für <i>in-vitro</i> Diagnostika |  | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum |
|  | Gebrauchsanweisung beachten |  | Eindeutige Produktidentifizierung |
|  | Vor Sonnenlicht schützen |  | Inhalt |

1. Zweckbestimmung

MycoReal® Kit *Pneumocystis* ist ein nicht automatischer IVD real-time PCR Test zum qualitativen Nachweis der DNA (mt LSU Gen) von *Pneumocystis jirovecii*.

Geeignete Untersuchungsmaterialien sind DNA-Extrakte isoliert aus Proben des humanen Respirationstraktes (bronchoalveoläre Lavage, BAL).

Dieser Test ist für Patienten aller Altersgruppen mit Verdacht auf eine Infektion mit *P. jirovecii* geeignet und dient in Kombination mit der Krankengeschichte und zusätzlichen klinischen Informationen zur Unterstützung der Diagnose einer *P. jirovecii* Infektion.

Der Test ist für den professionellen Gebrauch bestimmt und darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.

2. Produktbeschreibung

MycoReal® Kit *Pneumocystis* ist ein real-time PCR Test und detektiert im Fluoreszenzkanal für FAM das mitochondrial large-subunit rRNA Gen (mt LSU) von *P. jirovecii*.

Eine Sonden-spezifische Amplifikationskurve im Fluoreszenzkanal für FAM zeigt die Amplifikation der *P. jirovecii* spezifischen DNA. Die interne DNA Positivkontrolle (IPC) wird im Cy5 Kanal detektiert und dient als Kontrolle der DNA Extraktion und möglicher real-time PCR Inhibition. Das Target für die DNA IPC (artifizielle Target DNA) wird während der Probenextraktion zugegeben.

Dieser Test wurde mit dem ABI® 7500 Fast Real-time PCR System (Fast Cycle Parameter werden nicht unterstützt, Thermo Fisher Scientific) validiert und zusätzlich mit dem QuantStudio™ 7 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific), LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics) und Mic instrument (bio molecular systems) getestet. Er eignet sich aber auch für andere real-time PCR Geräte, die Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren können (z.B. QuantStudio™ 5, qTOWER³G (Analytik Jena), cobas z 480 Analyzer (Roche), Mx3005P® (Agilent)).

Bei Verwendung von PCR-Plattformen, die nicht von ingenetix getestet wurden, muss eine Evaluierung der Multiplex-PCR durchgeführt werden. Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Ingenetix MycoReal®, BactoReal®, ViroReal®, PanReal und ParoReal® Kits sind darauf optimiert, mit dem gleichen Temperaturprofil den Nachweis von DNA und RNA in einem PCR Lauf zu ermöglichen.

3. Erregerinformation

Pneumocystis jirovecii (früher *Pneumocystis carinii*) ist ein hefeartiger Pilz, der weltweit verbreitet ist. *Pneumocystis jirovecii* ist eine eigenständige Art, die nur den Menschen infiziert, während die verwandte Art *P. carinii* in Nagetieren und anderen Säugetieren zu finden ist. Die Übertragung von *Pneumocystis* durch die Luft von Wirt zu Wirt ist in Nagetiermodellen nachgewiesen worden, und mehrere Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine interindividuelle Übertragung beim Menschen stattfindet. Sowohl gesunde als auch immungeschwächte Menschen können mit *P. jirovecii* kolonisiert werden.

Obwohl gesunde Menschen davon nicht betroffen sind, kann *P. jirovecii* eine interstitielle Pneumocystis-Pneumonie (PCP) verursachen bei HIV-Patienten, bei Personen mit primären Immundefekten, einschließlich Hypogammaglobulinämie und schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID), bei Patienten, die langfristige immunsuppressive Therapien für Bindegeweberkrankungen, Vaskulitiden oder Festorgantransplantationen erhalten, bei Patienten mit hämatologischen und nicht-hämatologischen Malignomen, einschließlich solider Tumore und Lymphome, und bei Personen mit schwerer Unterernährung.

Gegenwärtig stützt sich die Diagnose von PCP auf mikroskopische Methoden oder PCR, da *P. jirovecii* in mikrobiologischen Routinelabors nicht kultiviert werden kann.

4. Grundprinzip der real-time PCR

Der Test basiert auf der Multiplex real-time Polymerase-Kettenreaktion mittels 5'-Nuklease-Assay Technologie. Dazu werden spezifische DNA-Bereiche amplifiziert und die generierten PCR-Produkte mit Hilfe fluoreszenz-markierter Oligonukleotid-Sonden detektiert. Dies ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

Während der PCR werden Primer mittels *Taq*-Polymerase verlängert und die mit dem Target hybridisierten Sonden durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase gespalten. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz der Sonde mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wird im real-time PCR Gerät im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus bei verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen erfasst.

Der Cq-Wert (Cq= Quantification cycle, Ct = Cycle threshold, Cp = Crossing point) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

5. Kit Inhalt, Stabilität und Lagerung

Tabelle 1

| Beschriftung | Inhalt | Menge | Lagerung |
|--|---|-------------|---|
| Pneumocystis + IPC3 Assay Mix (grüner Verschluss) | Primer + Sonden für Detektion von - <i>P. jirovecii</i> (FAM) - DNA IPC (Cy5) | 1 x 50 µl | -25 bis -15 °C |
| IPC-Target (DNA) (oranger Verschluss) | Target für DNA IPC (internes DNA Positivkontrollsystem) | 1 x 200 µl | -25 bis -15 °C |
| Pneumocystis Positive Control (roter Verschluss) | DNA Positivkontrolle (ca. 1.000 Targetkopien/µl) | 1 x 300 µl | -25 bis -15 °C |
| DNA Reaction Mix (weißer Verschluss) | PCR Reaktionsmix für DNA Amplifikation | 1 x 500 µl | -25 bis -15 °C nach Anbruch 2 bis 8 °C |
| Nuclease-free water (blauer Verschluss) | Nuclease-freies Wasser | 1 x 1000 µl | -25 bis -15 °C |

DNA Reaction Mix

Der mitgelieferte DNA-Amplifikationsmix ist für zuverlässige, hoch-sensitive real-time PCR ausgelegt. Der Master Mix enthält eine hoch gereinigte rapid hot-start *Taq* DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP und Uracil-N Glycosylase (UNG) um eine Amplicon Verschleppung zu verhindern, ROX™ Farbstoff als passive Referenz und Pufferkomponenten – Additive optimiert auf den Umgang mit RT-PCR Inhibitoren.

Lieferung und Haltbarkeit

Die Lieferung des Kits erfolgt mit Coolpacks oder auf Trockeneis. Bei sachgemäßer Lagerung sind die Kitkomponenten bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar. Dies gilt auch nach Anbruch. Kit vor Licht geschützt lagern.

Qualitätskontrolle Freigabetestung

In Übereinstimmung mit dem ISO 13485-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von ingenetix wird jede Charge anhand vorgegebener Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

Die Qualitätskontrolle erfolgt mit einem Plasmid, welches Teile der Erreger DNA enthält. Die DNA-Konzentration des Plasmids wurde bei einer OD von 260 nm bestimmt und die Kopienanzahl berechnet.

6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für DNA-Extraktion, die für die Extraktion des angeführten Probenmaterials geeignet sind (siehe 9. Vorbereitung der Proben)
- Nuklease-freies Wasser
- Puderfreie Laborhandschuhe (Einweghandschuhe)
- Pipetten (einstellbar)
- Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann (siehe 2. Produktbeschreibung)
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße mit zugehörigem (optischen) Verschlussmaterial
- Optional: Laminar-Flow-Sterilbank
- Optional: PCR-Workstation

7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

7.1. Generelle Hinweise

- In-vitro-Diagnostikum: Dieses Produkt darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.
- Der Transport von klinischen Proben muss den örtlichen Vorschriften für den Transport von Biologischen Stoffen entsprechen.
- Proben sollten als potenziell infektiös behandelt werden, gemäß den Vorschriften für sicheres Laborarbeiten. Tragen Sie puderfreie Einweghandschuhe bei der Handhabung von klinischem Probenmaterial und Kitreagenzien.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall müssen gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Eine unsachgemäße Entnahme, Beförderung oder Lagerung der Proben kann die Fähigkeit des Assays zum Nachweis der Zielsequenzen beeinträchtigen.
- Die Qualität der DNA hat großen Einfluss auf die Testperformance. Es muss sichergestellt sein, dass das verwendete DNA-Extraktionssystem mit real-time PCR Technologie kompatibel ist.
- Das real-time PCR Gerät sollte regelmäßig kalibriert, gewartet und gereinigt werden.
- Kitkomponenten sollten vor Licht geschützt werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen sollten nicht vermischt werden. Beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.

7.2. Spezifische Hinweise

Es muss ein Arbeitsablauf eingehalten werden, der falsch positive Ergebnisse aufgrund von Detektion kontaminierender DNA verhindert.

Empfohlene Maßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen:

- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation nötig. Materialien und Geräte müssen den einzelnen Arbeitsplätzen zugeordnet sein, um den Arbeitsablauf von Prä- zu Post-PCR im Labor zu gewährleisten.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Probenaufbereitung sollte in einer Laminar-Flow-Sterilbank erfolgen. Laminar-Flow-Sterilbank regelmäßig in allen Bereichen reinigen.
- Die Vorbereitung der real-time PCR sollte in einer PCR-Workstation erfolgen.
- Nach Möglichkeit Verbrauchsmaterialien und Pipetten in der Laminar-Flow-Sterilbank und in der PCR-Workstation belassen.
- Die Verwendung von sterilen aerosol-resistenten Pipettenspitzen ist erforderlich.
- Nur DNA-freie Verbrauchsmaterialien verwenden.
- Labormantel tragen.
- Nur mit puderfreien Einweghandschuhen arbeiten, beim Anziehen die Handfläche und Finger der Handschuhe außen nicht berühren. Handschuhe öfters wechseln. Um Hautkontakt zu vermeiden, Handschuhe über die Ärmel des Labormantels ziehen. Eventuell Einweg-Ärmelschoner verwenden.
- Nicht den Rand oder das Gewinde von offenen Reagenzgefäßen berühren.

- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Lagern Sie positives oder potenziell positives Material separat von allen anderen Reagenzien.
- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse muss eine Negativkontrolle während der DNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit Erreger DNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- Optional: In jedem PCR-Lauf kann eine PCR-Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser statt Probe, NTC) mitgeführt werden.

8. Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse mit diesem Test sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport und Lagerung der Proben sowie eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens gewährleistet.
- Mit diesem Kit wurde die DNA-Extraktion und Detektion von *Pneumocystis jirovecii* DNA aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) validiert.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer *P. jirovecii* Infektion nicht aus, da die Ergebnisse durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder eine Erregerzahl unterhalb der Nachweisgrenze beeinträchtigt werden können. PCR Inhibitoren können zu einem ungültigen Ergebnis führen.
- Obwohl für diesen Kit hochspezifische Primer und Sonden gewählt wurden, können eventuell vorhandene Sequenzvariabilitäten in der Target-Region von bislang nicht bekannten klinischen Subtypen zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen führen.
- Ergebnisse sollten mit anderen Labordaten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden.

9. Vorbereitung der Proben

Myc^oReal[®] Kit *Pneumocystis* eignet sich für die Untersuchung von DNA-Extrakten aus bronchoalveolärer Lavage (BAL).

Die Probenaufbereitung sollte mit den empfohlenen Maßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen erfolgen (siehe Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise). Es muss immer eine DNA-Extraktion Negativkontrolle (NTC) mitgeführt werden (Wasser anstelle von Probenmaterial).

Gereinigte DNA sollte bei -25 bis -15 °C gelagert werden.

9.1. Probeentnahme und Lagerung

BAL kann in Mikrozentrifugenröhrchen aufbewahrt werden. Es wird empfohlen, die Proben sofort nach der Entnahme zu verarbeiten. Lagern Sie die Proben bei 2-8 °C für nicht länger als 48 Stunden oder frieren Sie diese bei -20/-80 °C ein.

9.2. Empfohlene Extraktionsmethoden

Stellen Sie sicher, dass das angewendete Extraktionssystem nicht mit DNA von Erregern kontaminiert ist, welche mit Myc^oReal[®] Kit *Pneumocystis* nachgewiesen werden. Extrahieren Sie die Probe mit einem DNA-Extraktionssystem, das mit der real-time PCR Technologie kompatibel ist und für die Extraktion des Probenmaterials geeignet ist.

Für manuelle Extraktion empfohlen

- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)

Für automatisiertes Extraktionsverfahren empfohlen

- innuPREP AniPath DNA RNA – KFFLX Kit (Analytik Jena) mit dem KingFisher FLEX Extraktionsgerät (Thermo Fisher Scientific)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit mit dem MagNA Pure Compact oder Roche MagNAPure 96 System (Roche)

Bei Verwendung von Extraktionsverfahren, die nicht von ingenetix empfohlen werden, muss eine Evaluierung der Extraktionsmethode durchgeführt werden.

9.3. Qualitätskontrolle für DNA-Extraktion und PCR-Inhibition mit IPC

Ein DNA IPC System (internes DNA-Positivkontrollsystem) dient als Kontrolle für die DNA-Extraktion, identifiziert eine mögliche PCR-Inhibition und bestätigt die Integrität der Kit-Reagenzien.

Hierfür wird eine artifizielle Ziel-DNA (IPC-Target (DNA), ca. 6×10^5 Kopien/ μ l) während der Extraktion zugegeben.

Hinweis: Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und von der Art des Probenmaterials. Negative Proben sollten Cq-Werte der IPC zwischen 27-30 zeigen. Die verwendete Extraktionsmethode muss dementsprechend mit Probenmaterial validiert werden. Setzen Sie das IPC-Target (DNA) frisch verdünnt (1:10 mit Nuklease-freiem Wasser) in die Extraktion ein, falls bei der Validierung mit Proben Cq Werte < 27 ermittelt werden.

9.3.1. Anwendung der IPC als Kontrolle der Extraktion und real-time PCR

Das IPC-Target (DNA) wird während der Extraktion zugesetzt.

→ Pipettieren Sie pro Probe 1 μ l IPC-Target (DNA) (oranger Verschluss) direkt zum entsprechenden Volumen an Lysepuffer (oder Zugabe zur Probe nachdem der Lysepuffer zur Probe pipettiert wurde) und setzen Sie dann die Extraktion fort.

Achtung: Das IPC-Target (DNA) darf nicht direkt dem Probenmaterial in Abwesenheit von Lysepuffer zugesetzt werden, da es abgebaut werden könnte. Es muss zum Lysepuffer zugegeben werden.

10. Vorbereitung der real-time PCR

- Pro PCR-Lauf müssen eine Positivkontrolle (roter Verschluss), eine Negativkontrolle der DNA-Extraktion und optional eine PCR-Negativkontrolle (NTC, z.B. Nuklease-freies Wasser) mitgeführt werden.
- Generell wird empfohlen, Proben in Duplikaten zu analysieren, um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhöhen und die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern.
- DNA-Proben auf Eis auftauen.
- Kitkomponenten müssen vollständig bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen werden die einzelnen Komponenten vorsichtig gemischt und kurz mit niedriger Umdrehungszahl abzentrifugiert.
- Den DNA-Reaktionsmix vorsichtig mischen, um eine homogene Lösung zu gewährleisten.
- **Positivkontrolle**
→ Setzen Sie 9 µl Positivkontrolle ein (roter Verschluss). Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren.

10.1. Pipettierschema

| | | Pro Probe |
|--|---------------------------------|------------------|
| Ansetzen Master Mix (gut durchmischen) | DNA Reaction Mix | 10,0 µl |
| | Pneumocystis + IPC3 Assay Mix | 1,0 µl |
| | Gesamtvolumen Master Mix | 11,0 µl |
| Ansetzen PCR-Reaktion | Master Mix | 11,0 µl |
| | DNA-Probe* | 9,0 µl |
| | Gesamtvolumen | 20,0 µl |

*Von der Probe können 1-9 µl eingesetzt werden. Bei ≠ 9 µl Probe muss das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser angepasst werden.

→ **Falls das IPC-Target (DNA) nicht während der Extraktion zugegeben wurde:**

Verdünnen Sie das IPC-Target (DNA) (oranger Verschluss) frisch 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl pro Probe direkt zum Master Mix zu. In diesem Fall dient die IPC zur Qualitätskontrolle der real-time PCR. Es können nur 8 µl DNA-Probe analysiert werden.

Achtung: Bei Verwendung von mehr als 1 µl verdünntem IPC-Target (DNA) pro Reaktion wird die real-time PCR Reaktion möglicherweise inhibiert.

- Bereiten Sie den Master Mix entsprechend der Probenanzahl vor, berechnen Sie dabei ein zusätzliches Volumen von ca. 10% für den Pipettierverlust.
- Pipettieren Sie pro Probe jeweils 11 µl des vorbereiteten Master Mixes in das Well der optischen Reaktionsplatte.
- Geben Sie anschließend 9 µl der extrahierten Probe oder der Kontrollen zu. Pipettieren Sie die Positivkontrolle zum Schluss.
- Verschließen Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Verschlussmaterial.
- Vortexen Sie die verschlossene Platte für ein 1-2 Sekunden und zentrifugieren Sie die Platte kurz ab.

10.2. Programmierung des Temperaturprofils

Weitere Informationen zur Programmierung der PCR-Geräte finden Sie im jeweiligen Benutzerhandbuch des Herstellers. Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Probenvolumen: 20 µl

Ramp speed: Ohne "fast cycling" Parameter für ABI® 7500 Fast Instrument, QuantStudio™ (Thermo Fisher Scientific)

| Program 1 | Program 2 | Program 3 |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| Cycles: 1 Analysis: None | Cycles: 1 Analysis: None | Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60 °C |
| 50 °C | 95 °C 2 min | 95 °C 5 sec 60 °C 1 min |
| 2 min | | |

Ad Program 1: Falls im selben PCR-Lauf auch virale RNA nachgewiesen werden soll, muss im Programm 1 auf 15 min bei 50 °C verlängert werden. Dieses Temperaturprofil kann für alle ingenetix ViroReal®, BactoReal®, MycoReal®, PanReal und ParoReal® Kits zum Nachweis von DNA oder RNA verwendet werden.

Ad Program 2: Das bisherige Temperaturprofil mit 20 sec in Programm 2 kann nach wie vor verwendet werden.

Auswahl der Detektionskanäle

FAM Kanal: Detektion von *Pneumocystis jirovecii*

Cy5 Kanal: Detektion von IPC

Für ABI® 7500 Instrument, QuantStudio™ 5/6/7 (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent)

FAM-TAMRA

Cy5-NONE

Passiver Referenzfarbstoff: ROX

Für MIC Instrument (bio molecular systems)

FAM Green

Cy5 Red

Passiver Referenzfarbstoff: kein ROX nötig

Für cobas z 480 Analyzer / LightCycler® 480 II (Roche)

Detection format: 2 Color Hydrolysis Probe

FAM: Anregung bei 465 nm, Emission bei 510 nm

Cy5: Anregung bei 610 / 618 nm, Emission bei 670 / 660 nm

Passiver Referenzfarbstoff: kein ROX nötig

11. Interpretation der Daten

Für die Analyse der PCR-Ergebnisse wählen Sie die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen FAM Kanal für das Erreger Target und Cy5 Kanal für die IPC.

Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen bei der Verwendung einer Multiplex-PCR mit FAM und Cy5 eine Color Compensation benötigen.

Wichtig: Die Proben sollten sowohl in der logarithmischen (Roche Gerät: Abs Quant/Fit Points) als auch linearen Ansicht überprüft und mit den Negativkontrollen verglichen werden.

Überprüfen Sie neben den Cq-Werten auch die Amplifikationskurven und passen Sie gegebenenfalls den Threshold (noise band) an. Nachdem Sie die neuen Einstellungen gespeichert haben, exportieren Sie die Daten. Im Falle des cobas z 480 Analyzer exportieren Sie die Tabellen pro Farbstoff.

Die Bewertung der Testergebnisse klinischer Proben sollte erst durchgeführt werden, nachdem die Positiv- und Negativkontrollen überprüft und für valid befunden worden sind. Wenn die Resultate der Kontrollen nicht valid sind, können die die Ergebnisse der klinischen Proben nicht interpretiert werden.

Negative Proben:

Proben ohne Amplifikationskurven (keine Cq-Werte, „undetermined“) werden negativ gewertet. Bei diesen Proben wurde keine DNA nachgewiesen, da keine Infektion mit den untersuchten Erregern vorliegt oder die Erreger DNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Positive Proben:

Proben mit Cq-Werten < 45 im Fluoreszenzkanal für das Erreger Target werden positiv gewertet.

Tabelle 2 zeigt die Kriterien für valide positive und negative Kontrollen. Tabelle 3 zeigt die Interpretation der Daten mit klinischen Proben.

11.1. Kontrollen

Tabelle 2 Kriterien für valide Kontrollen, wenn das IPC-Target (DNA) während der Extraktion zugegeben wurde

| | Cq FAM Kanal <i>Pneumocystis</i> Target | Cq Cy5 Kanal IPC ¹ | Interpretation | Vorgehensweise |
|---------------------------------|--|----------------------------------|----------------|----------------|
| Positivkontrolle | <30 | Negativ | Valid | - |
| Positivkontrolle | Negativ | Negativ | Invalid | Siehe 12.1 |
| Negativkontrolle der Extraktion | Negativ | 27-30 ² | Valid | - |
| Negativkontrolle der Extraktion | Negativ | Negativ | Invalid | Siehe 12.1 |
| Negativkontrolle der Extraktion | Positiv | 27-30 ² | Invalid | Siehe 12.3 |
| NTC PCR (optional) | Negativ | Negativ | Valid | - |
| NTC PCR (optional) | Positiv | Negativ | Invalid | Siehe 12.2 |

¹ Falls das IPC-Target (DNA) direkt zum Mastermix zugegeben wurde, müssen alle Proben im Cy5 Kanal positiv sein.

² Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und sollten Cq Werte zw. 27-30 zeigen (siehe 9. Vorbereitung der Proben).

11.2. Klinische Proben

Proben mit positiven Cq-Werten sind als positiv zu bewerten, siehe Tabelle 3.

Tabelle 3 Interpretation von Daten klinischer Proben

| | Cq FAM Kanal <i>Pneumocystis</i> Target | Cq Cy5 Kanal IPC | Interpretation | Vorgehensweise |
|------------------------|--|------------------------------|----------------|----------------|
| Klinische Probe | Negativ | 27-30 ¹ | Negativ | - |
| Klinische Probe | Positiv | Positiv/Negativ ² | Positiv | - |
| Klinische Probe | Negativ | Negativ | Invalid | Siehe 12.5 |

¹ Das positive Signal der IPC schließt eine mögliche PCR-Inhibition aus. Die IPC Cq-Werte sollten jedoch zwischen den Proben vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Cq-Werte kann auf eine partielle Inhibition hindeuten. Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und sollten Cq Werte zw. 27-30 zeigen (siehe 9. Vorbereitung der Proben).

² Eine hohe Erregerkonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der IPC führen.

Im Fall von invaliden Daten muss die Analyse mit der restlichen oder einer frisch extrahierten DNA-Probe wiederholt werden (siehe 12. Troubleshooting).

12. Troubleshooting

12.1. Kein pathogenspezifisches Signal mit Positivkontrolle und IPC

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils oder fehlerhafte Einstellung der Detektionskanäle am real-time PCR Gerät.
 - Vergleichen Sie das Temperaturprofil und die Einstellung der Detektionskanäle mit den Angaben im Protokoll.
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
 - Überprüfen Sie die Pipettierschritte anhand des Pipettierschemas und wiederholen Sie die PCR falls nötig.
 - Die DNA ist möglicherweise abgebaut.
- Das IPC-Target (DNA) wurde unverdünnt direkt zum Mastermix gegeben und nicht frisch 1:100 verdünnt. Die PCR Reaktion ist dadurch inhibiert.
 - Stellen Sie eine frische 1:100 Verdünnung des IPC-Targets (DNA) her und wiederholen Sie die PCR.
- Es wurde keine Positivkontrolle zugegeben.
 - Falls alle klinischen Proben negativ sind, wiederholen Sie die PCR.
- Nur für Kontrolle der real-time PCR: das IPC-Target (DNA) muss 1:100 frisch verdünnt zum Mastermix zugegeben werden. Falls die Zugabe des IPC-Targets (DNA) vergessen wurde:
 - Stellen Sie eine frische 1:100 Verdünnung des IPC-Targets (DNA) her und wiederholen Sie die PCR.
- Für Kontrolle der DNA-Extraktion und real-time PCR: das unverdünnte IPC-Target (DNA) muss während der Extraktion zum Lysepuffer zugegeben werden. Falls die Zugabe des IPC-Targets (DNA) vergessen wurde:
 - Wiederholen Sie die DNA-Extraktion.

12.2. Erreger-Signal in der Negativkontrolle

- Falls Cq-Werte in der Negativkontrolle unterhalb des Cut-off liegen, der in der Gebrauchsanweisung spezifiziert ist, kam es zu einer Kontamination während der Vorbereitung der PCR.
 - Wiederholen Sie die PCR mit neuen Reagenzien in Replikaten.
 - Pipettieren Sie die Positivkontrolle immer zuletzt.
 - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

12.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion

- Falls Cq-Werte in der Negativkontrolle der Extraktion unterhalb des Cut-off liegen, der in der Gebrauchsanweisung spezifiziert ist, kam es zu einer Kontamination während der PCR oder DNA Extraktion.
 - Wiederholen Sie die PCR unter Verwendung neuer Reagenzien in Replikaten.
 - Falls wiederholt positiv: Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und PCR unter Verwendung neuer Reagenzien.
 - Pipettieren Sie die Positivkontrolle immer zuletzt.

→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden und die Arbeitsplätze von Proben mit hoher Bakterienkonzentration (z.B. Faeces, Speichel) getrennt sind.

12.4. IPC spezifisches Signal mit PCR Negativkontrolle und Positivkontrolle

- IPC-Target (DNA) wurde während der Extraktion zum Lysepuffer zugegeben, aber es gibt IPC spezifisches Signal mit der PCR-NTC und der Positivkontrolle: Kontamination mit dem IPC-Target (DNA)
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

12.5. Kein Signal mit IPC und kein pathogenspezifisches Signal in Probe

- Falsche Zuordnung der Detektionskanäle mit der Probe
→ Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren.
 - Die DNA ist möglicherweise abgebaut.
 - Falls das IPC-Target (DNA) während der Extraktion zugegeben wurde:
 - PCR Inhibierung könnte vorliegen.
 - DNA-Extraktion ist fehlgeschlagen.
 - Das IPC-Target (DNA) wurde nicht zum Lysepuffer der Probe pipettiert.
 - Die extrahierte Probe wurde nicht zur PCR-Reaktion zugegeben.
- Eine Aussage ist nicht möglich. Überprüfen Sie, ob eine empfohlene DNA-Extraktionsmethode verwendet wurde, und überprüfen Sie die einzelnen Arbeitsschritte der DNA-Extraktion.
- Können keine Bedienungsfehler bei der Extraktion nachvollzogen werden, empfiehlt es sich, die PCR mit geringeren Mengen an DNA-Eluat (1/5 oder 1/10 des Probenvolumens + das entsprechende Volumen an Nuklease-freiem Wasser) zu wiederholen.

13. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance

13.1. Testperformance

Abbildung 1 zeigt die Performance von MycoReal® Kit *Pneumocystis* mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific).

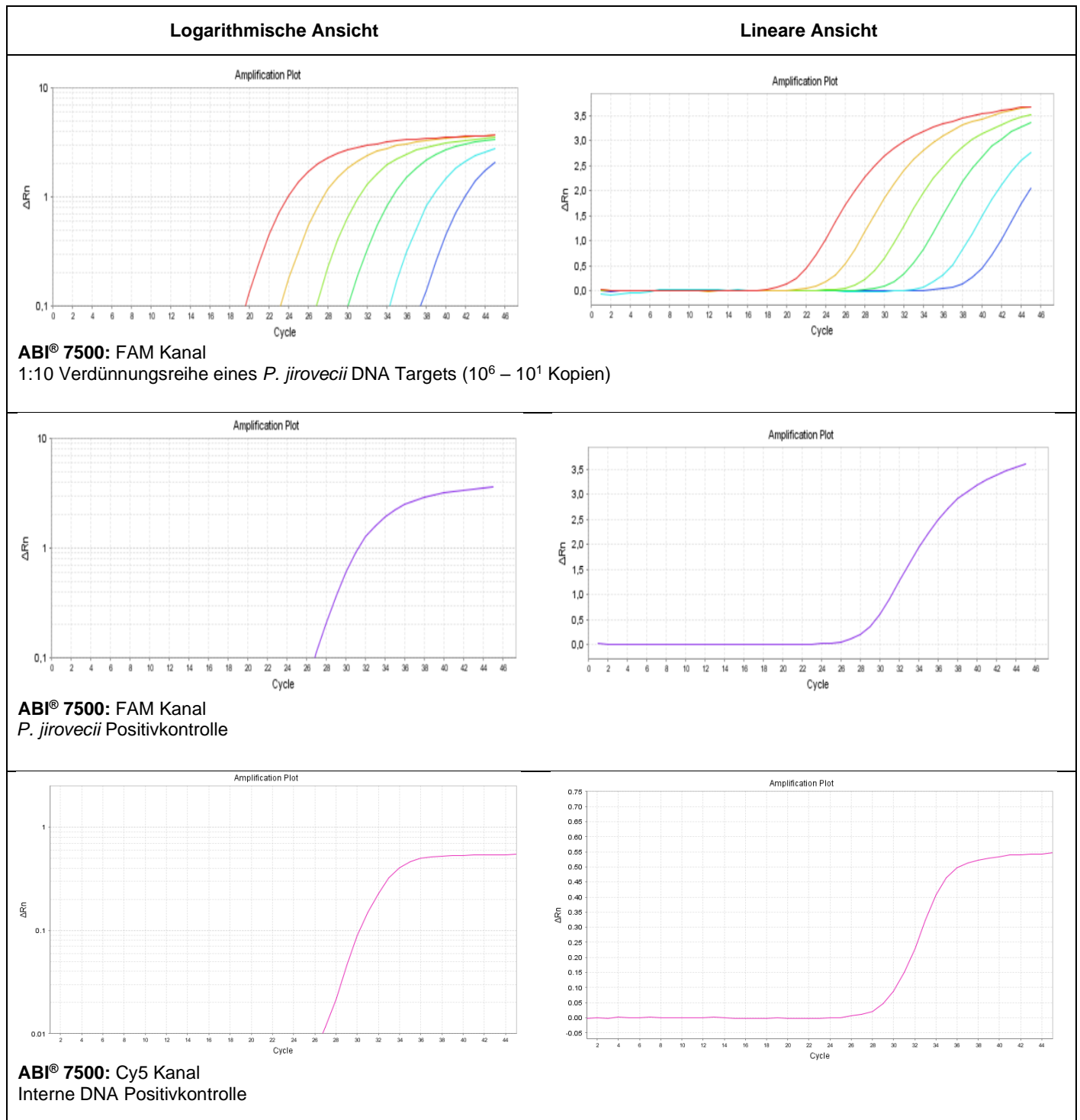


Abbildung 1 Performance des MycoReal® Kit *Pneumocystis*

Dieser Test wurde mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific) validiert und zusätzlich mit dem QuantStudio™ 7 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific), LightCycler® 480 Instrument II (Roche) und Mic instrument (bio molecular systems) getestet.

13.2. Nachweisgrenze, LoD95%

Methode: MycoReal® Kit *Pneumocystis* wurde mit einer 10-fach Verdünnungsreihe eines Plasmids, welches Teile der *P. jirovecii* DNA enthält, getestet.

Die Nachweisgrenze (LoD95% = kleinste Kopienzahl der Ziel-DNA, die in 95% der Fälle nachgewiesen werden kann) wurde mit Plasmid Verdünnungen rund um die analytische Sensitivität (25, 20, 15, 10, 7.5 und 5 Zielkopien) mittels einer non-linearen Kurvenanpassung mit der Graph Pad Prism Software ermittelt.

Resultat: Die LoD95% beträgt 5 Zielkopien/Reaktion. Das mt LSU-Gen von *P. jirovecii* ist ein Multikopie-Gen und ist bis zu 15-mal im Genom von *P. jirovecii* vorhanden (Valero et al., 2016).

13.3. Linearität und dynamischer Messbereich

Methode: Die Linearität wurde mit einer 10-fachen Verdünnungsreihe ($10^6 - 10^1$ Zielkopien/Reaktion) des Plasmids bestimmt. Die Anzahl der Bestimmungen (n) pro Verdünnung beträgt zehn.

Resultat: Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Zielkopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von $-3,568 \pm 0,02560$ und einem R^2 von $> 0,99$ (Abbildung 2).

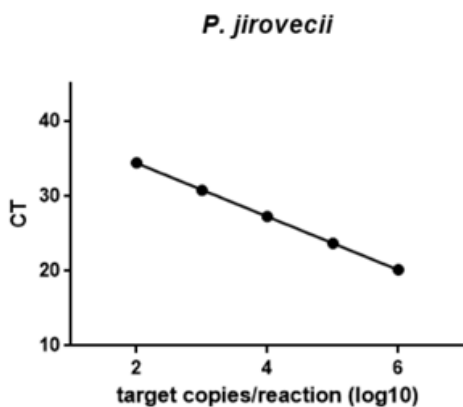


Abbildung 2 10-fache Verdünnungsreihe eines *P. jirovecii* DNA Standards

13.4. Präzision

Methode: Die Präzision innerhalb eines Laufs (Intra-Assay), zwischen mehreren Läufen (Inter-Assay) und zwischen zwei Lots (Inter-Lot) wurde bestimmt.

Resultat: Der Variationskoeffizient (CV%) liegt für die Intra-Assay Präzision im Mittel bei 0,8%, für die Inter-Assay Präzision bei 0,8% und für die Inter-Lot Präzision bei 1,9%.

13.5. Analytische Spezifität

Methode BLAST Analyse: Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. Die Spezifität der Primer und Sonden wurde *in silico* validiert, indem das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) gegen die NCBI-Datenbank durchgeführt wurde. Primer und Sonden wurden auf potentielle Homologien zu derzeit publizierten Sequenzen kontrolliert. Diese Analyse validiert den Nachweis derzeit bekannter *P. jirovecii* Stämme.

Resultat: Bei den BLAST Analysen wurden mögliche Kreuzreaktionen mit erwarteter geringerer Sensitivität mit einigen *Pneumocystis carinii* Stämmen, die aus Makakken isoliert wurden, festgestellt. Es wurden keine relevanten Sequenzvariabilitäten in der Primer- und Sonden Region von *P. jirovecii* Stämmen beobachtet.

Methode Testung Exklusivität: Die analytische Spezifität wurde weiters mit genomischer DNA von *Candida* und *Aspergillus* Isolaten getestet (Tabelle 3).

Resultat: Es wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet.

Tabelle 4

| Getestete Pilzisolat | Resultat |
|------------------------------|----------|
| <i>Candida albicans</i> | Negativ |
| <i>Candida dubliniensis</i> | Negativ |
| <i>Candida tropicalis</i> | Negativ |
| <i>Candida krusei</i> | Negativ |
| <i>Candida parapsilosis</i> | Negativ |
| <i>Candida lusitanae</i> | Negativ |
| <i>Candida glabrata</i> | Negativ |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Negativ |
| <i>Aspergillus flavus</i> | Negativ |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Negativ |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | Negativ |
| <i>Aspergillus niger</i> | Negativ |

13.6. Diagnostische Evaluierung

Methode:

Die diagnostische Evaluierung des MycoReal® Kit *Pneumocystis* wurde von einem externen Dienstleister mit 200 DNA-Isolaten aus menschlicher bronchoalveolärer Lavage (BAL) durchgeführt. Insgesamt wurden 98 bekannt *P. jirovecii* positive Proben sowie 102 bekannt *P. jiroveici* negative Nukleinsäurepräparationen aus BAL in die Studie eingeschlossen. Die DNA wurde mit dem Roche MagNAPure 96 System mit dem MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit isoliert. Die Resultate wurden mit den Daten einer vorab getesteten DIN EN ISO 15189 akkreditierten Referenzmethode verglichen (Detektion des Multicopy Gens MSG Gen, HybProbes basierter Test). Die Testung erfolgte mit dem LightCycler® 480 II real-time PCR Gerät (Roche).

Resultat:

96 Proben, welche mit der akkreditierten Referenzmethode positiv getestet wurden, waren ebenfalls positiv mit MycoReal® Kit *Pneumocystis*. Zwei weitere Proben mit Cq-Werten von mehr als 35, die mit den Referenzmethoden positiv für *P. jirovecii* waren, waren mit dem MycoReal® Kit *Pneumocystis* negativ. Die restlichen 102 DNA Proben, welche negativ auf *P. jirovecii* mit der Referenzmethode getestet wurden, waren ebenfalls negativ mit MycoReal® Kit *Pneumocystis*.

Die diagnostische Bewertung des MycoReal® Kit *Pneumocystis* ist in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5 Gesamtergebnisse von 200 getesteten klinischen Isolaten, 2x2 Kontingenztabelle

| | Referenz | | | Total |
|--------------------------------------|----------|-----|-----|-------|
| | | pos | neg | |
| MycoReal® Kit <i>Pneumocystis</i> | pos | 96 | 0 | 96 |
| | neg | 2 | 102 | 104 |
| Total | | 98 | 102 | 200 |

Tabelle 6 Statistische Auswertung der diagnostischen Validierung

| | Wert | 95% CI |
|--------------|---------|--------------------|
| Sensitivität | 97,96% | 92,82% bis 99,75% |
| Spezifität | 100,00% | 96,41% bis 100,00% |
| NPV | 98,08% | 92,82% bis 99,51% |
| PPV | 100,00% | - |
| Prävalenz | 49,00% | |
| Genauigkeit | 99,00% | 96,43% bis 99,88% |

14. Literatur

- Medrano, F.J., M. Montes-Cano, M. Conde, C. de la Horra, N. Respaldiza, A. Gasch, M.J. Perez-Lozano, J.M. Varela, E.J. Calderon. 2005. *Pneumocystis jiroveci* in general population. Emerg. Infect. Dis. 11: 245–250.
- Valero C, Buitrago MJ, Gits-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclère A, Hamane S, Guigue N, Bretagne S, Alanio A. 2016. Copy Number Variation of Mitochondrial DNA Genes in *Pneumocystis jirovecii* According to the Fungal Load in BAL Specimens. Front Microbiol. 12;7:1413.

15. Änderungsindex

| Änderung | Datum | Beschreibung |
|----------|------------|--|
| 1.0 | 25.05.2022 | Erstversion |
| 1.1 | 01.05.2023 | <p>Änderung der Firmenadresse</p> <p>5. Inhalt, Stabilität und Lagerung Kitversion 1.1: Geändertes Füllvolumen von IPC-Target (DNA) und Positivkontrolle Das DNA IPC Target wird nicht mehr in RNA/DNA Stabilizer aufbewahrt und wurde zu IPC-Target (DNA) umbenannt.</p> <p>7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise Update dieser Sektion. Aufnahme zusätzlicher Informationen zur Probenentnahme und -lagerung, zur Verarbeitung der Proben nach der Entnahme, zu den Lagerbedingungen der Proben, zu den Transport- und Lagerbedingungen der gereinigten DNA. Empfohlene Maßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen eingefügt.</p> <p>9. Probenvorbereitung Update von Absatz über Qualitätskontrolle für DNA-Extraktion und PCR-Inhibition Hinweis, dass das IPC-Target (DNA) bei Cq Werten <27 vor der Extraktion verdünnt werden muss.</p> <p>11. Auswertung der PCR-Daten Tabelle 1 und Tabelle 2: Update</p> |

Hinweis:

Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und / oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

Technischer Support:

ingenetix GmbH, Haidingergasse 1, 1030 Wien, Österreich
Telefon: +43 (0)1 36 198 01; **E-Mail:** office@ingenetix.com