

RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii*

REF PG1905



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* DNA aus humaner bronchoalveolären Lavage (BAL).^{1,2}

Die RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch *Pneumocystis jirovecii* verursachten respiratorischen Infektion unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Pneumocystis jirovecii (ehem. *P. carinii*) gehört zur Familie der *Pneumocystidaceae* und kann zu einer interstitiellen Lungenentzündung führen. Opportunistische Infektionen sind ein großes Problem in Patienten mit geschwächtem Immunsystem, zum Beispiel HIV/AIDS Patienten, Krebspatienten und Patienten, die eine Organtransplantation erhalten. *Pneumocystis jirovecii* führt zu einer respiratorischen Infektion und ist die häufigste opportunistische Erkrankung in HIV-infizierten Menschen. In der gesunden Population ist *Pneumocystis jirovecii* nicht pathogen und in der Bevölkerung weit verbreitet. Immunsupprimierte Menschen jedoch entwickeln eine Pneumonie mit Symptomen wie trockenem Husten, Atemnot, Tachypnoe und Fieber.³ Obwohl die Einführung der HAART Therapie 1996, die *Pneumocystis jirovecii* Inzidenz um 3.4 % jährlich reduziert hat, sind immer noch 9 % der hospitalisierten HIV Patienten und 1 % der organtransplantierten Patienten mit *Pneumocystis jirovecii* infiziert.⁴ Laut dem Center for Disease Control (CDC) liegt die Mortalität bei Patienten ohne Behandlung bei 100 % und bei 5 % - 40 % in immunsupprimierten Patienten, die eine Behandlung erhalten haben.⁴ Die Mortalitätsrate durch *Pneumocystis jirovecii* in nicht-HIV infizierten Patienten kann bis zu 40 % betragen.⁵ Der Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* erfolgte bisher durch Immunfluoreszenzfärbung. Diese wird jedoch wegen der geringen Sensitivität durch die PCR ersetzt.²

3. Testprinzip

RIDA[®] GENE *Pneumocystis jirovecii* ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen und quantitativen Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* DNA aus bronchoalveolären Lavage (BAL).

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die für *Pneumocystis jirovecii* spezifischen Genfragemente (mt LSU; large subunit) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Mit Hilfe der im Kit enthaltenen Standards, Standard A, Standard B und Standard C ist eine Quantifizierung der Ergebnisse möglich. Der RIDA[®] GENE *Pneumocystis jirovecii* Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau
10 ^{^1}	Standard A	1x	100 µl	dunkelblau
10 ^{^3}	Standard B	1x	100 µl	dunkelblau
10 ^{^5}	Standard C	1x	100 µl	dunkelblau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii* multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab.2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA®Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler[®] 2.0
- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler[®] 480II
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Test die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Für die DNA-Präparation aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA[®]GENE Pneumocystis jirovecii Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control**, die **Internal Control DNA** und **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Standard (A, B, C): Je 5 µl **Standard** (A, B, C) zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Standards zu pipettieren.

Hinweis: Bei der Nutzung folgender Geräte muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden: ABI 7500 (Applied Biosystems) und CFX96™ (Bio-Rad).

Für alle anderen Geräte kann eine Standardkurve exportiert und importiert werden. Folglich muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt der Standardkurve (**Standard B**) als Kalibrator in das Experiment integriert werden. Die Applikation der Standardkurve ist für diese Geräte nur einmal pro Charge notwendig.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR Profil

Tab. 5: DNA real-time PCR Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: DNA real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Bei einer quantitativen Auswertung ist für **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** die Gesamtkopienanzahl je Reaktion in das Setup File des Softwareprogramms des jeweiligen real-time PCR-Gerätes einzutragen. Es werden 5 µl DNA eingesetzt, sodass sich folgende Konzentrationen ergeben:

Standard A: 5×10^1 Kopien/Reaktion

Standard B: 5×10^3 Kopien/Reaktion

Standard C: 5×10^5 Kopien/Reaktion

Hinweis: Die Standardkurve kann für jeden Parameter auf dem real-time PCR-Gerät abgespeichert werden. Ausgenommen von dem ABI 7500 (Applied Biosystems) und dem CFX96™ (Bio-Rad), ist die Applikation der Standardkurve nur einmal pro Charge notwendig. Bei der Nutzung des ABI 7500 (Applied Biosystems) und des CFX96™ (Bio-Rad) muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt (**Standard B**) der Standardkurve als Kalibrator in das Experiment integriert werden. Generell wird jedoch empfohlen immer bei jedem Lauf alle drei Standards mitzuführen.

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA® GENE DNA und RIDA® GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Bei einer quantitativen Auswertung ist für **Standard A**, **Standard B** und **Standard C** die Gesamtkopienanzahl je Reaktion in das Setup File des Softwareprogramms des jeweiligen real-time PCR-Gerätes einzutragen. Es werden 5 µl DNA eingesetzt, sodass sich folgende Konzentrationen ergeben:

Standard A: 5×10^1 Kopien/Reaktion

Standard B: 5×10^3 Kopien/Reaktion

Standard C: 5×10^5 Kopien/Reaktion

Hinweis: Die Standardkurve kann für jeden Parameter auf dem real-time PCR-Gerät abgespeichert werden. Ausgenommen von dem ABI 7500 (Applied Biosystems) und dem CFX96™ (Bio-Rad), ist die Applikation der Standardkurve nur einmal pro Charge notwendig. Bei der

Nutzung des ABI 7500 (Applied Biosystems) und des CFX96™ (Bio-Rad) muss bei jedem Lauf eine Standardkurve integriert werden. Für alle anderen Geräte muss bei jedem neuen Lauf nur ein Punkt (Standard B) der Standardkurve als Kalibrator in das Experiment integriert werden. Generell wird jedoch empfohlen immer bei jedem Lauf alle drei Standards mitzuführen.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**¹ Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

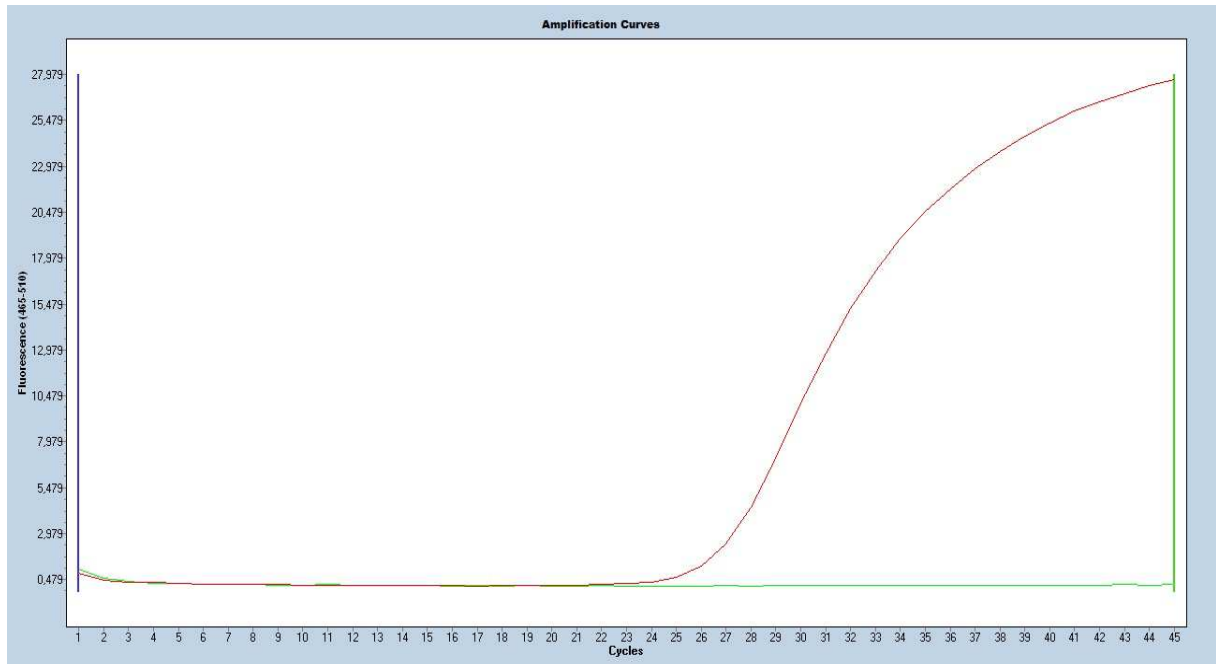


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Pneumocystis jirovecii*) auf dem LightCycler® 480II

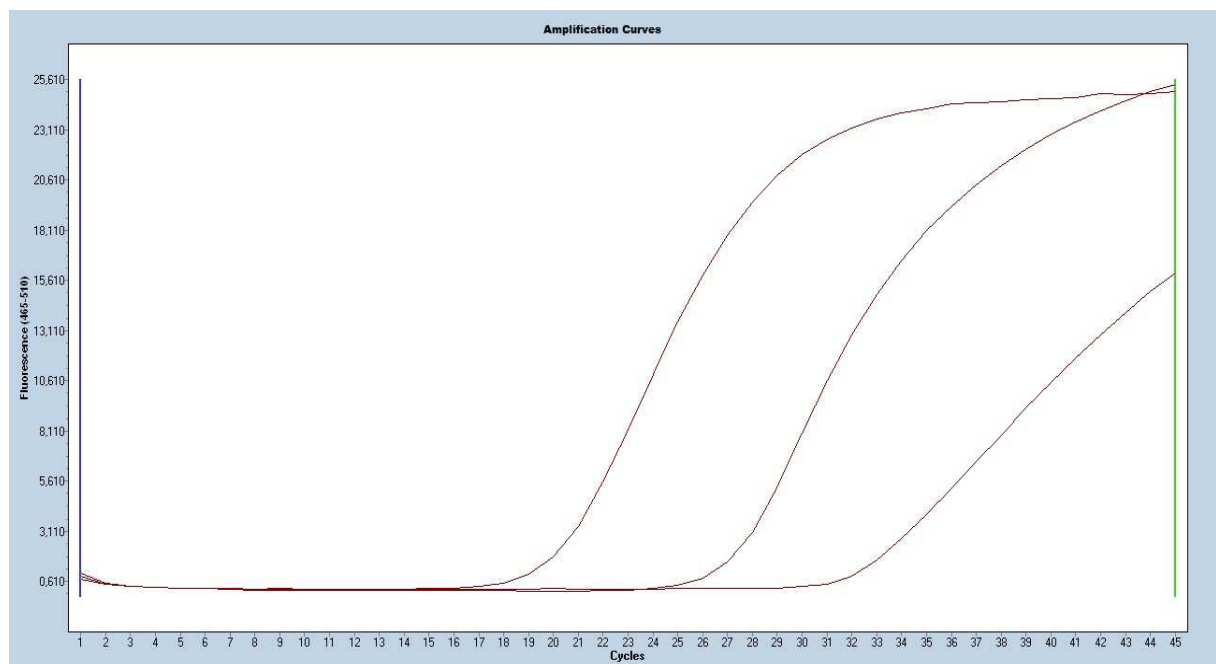


Abb. 2: Standardreihe *Pneumocystis jirovecii* mit **Standard A** (10^1 DNA Kopien/μl), **Standard B** (10^3 DNA Kopien/μl) und **Standard C** (10^5 DNA Kopien/μl) auf dem LightCycler® 480II

10.1 Gültigkeit bei quantitativem Nachweis

Damit die Gültigkeit eines quantitativen PCR-Laufes gegeben ist, müssen alle Kontrollbedingungen eines gültigen qualitativen diagnostischen PCR-Laufes erfüllt sein. Für korrekte Quantifizierungsergebnisse muss zusätzlich eine gültige Standardkurve erstellt werden. Es müssen folgende Werte der Kontrollparameter einer Standardkurve erreicht werden:

	Kontrollparameter	Gültiger Wert
Roche LightCycler® 2.0	Efficiency	1,9 – 2,1
Roche LightCycler® 480II	Efficiency	1,9 – 2,1
	Slope	-3,1 – -3,6
Agilent Techn. Mx3005P	Rsq	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
ABI 7500	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
Bio-Rad CFX96™	R ²	> 0,98
	Slope	-3,1 - -3,6
Qiagen Rotor-Gene Q	R ²	> 0,98
	M	3,1 – -3,6

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	ICD	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	<i>Pneumocystis jirovecii</i> nachweisbar
negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Pneumocystis jirovecii ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Pneumocystis jirovecii ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA führen können.

Pneumocystis jirovecii ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolation und Reinigung der Probe verbessert werden.

11.1 Quantifizierung der Proben

Um *Pneumocystis jirovecii* positive Proben zu quantifizieren, muss eine Standardkurvenmessung mit Standard A, Standard B und Standard C separat durchgeführt werden. Diese kann jedes Mal mitlaufen oder separat abgespeichert werden und kann in Folgeläufen bei Produkten der gleichen Chargennummer wieder importiert und genutzt werden.

Hinweis: Dies gilt nicht für folgende Geräte: ABI 7500 (Applied Biosystems) und CFX96™ (Bio-Rad). Hier muss bei jedem Lauf eine Standardkurve vermessen werden.

Für alle anderen Geräte ist es bei jedem neuen Lauf erforderlich, dass ein Punkt der Standardkurve (Standard B) als Kalibrator in das Experiment integriert wird.

Für die Quantifizierung der Proben, bei denen *Pneumocystis jirovecii* nachweisbar ist, werden die Reaktionen für die Standards (A, B und C), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sowie für die zu quantifizierenden Proben markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Ein korrektes Quantifizierungsergebnis ist nur zuverlässig möglich, wenn die Ct-Werte des *Pneumocystis jirovecii* spezifischen Zielgens (mt LSU; large subunit) im Ct-Bereich der Standards gemessen werden.

Mit der quantitativen RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii* multiplex real-time PCR wird der DNA-Gehalt des Parameters in Kopien/Reaktionsansatz ermittelt. Die Umrechnung in die Konzentrationseinheit Kopien/ml erfolgt über einen Korrekturfaktor K und berücksichtigt die Verdünnungen der DNA-Extraktion (abhängig vom verwendeten Extraktionskit) und des PCR-Ansatzes.

Die Umrechnung des Ergebnisses der quantitativen RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii* multiplex real-time PCR in Kopien/ml der Probe erfolgt mit folgender Formel:

$$C \text{ [Kopien/ml]} = c \text{ [Kopien/Reaktionsansatz]} \times K$$

- | | |
|----------------------------|--|
| C [Kopien/ml] | - Konzentration der Probe in Kopien/ml Probe |
| c [Kopien/Reaktionsansatz] | - DNA Konzentration im PCR-Reaktionsansatz
(Ergebnis der quantitativen PCR) |
| K | - Korrekturfaktor |

Für die Berechnung des Korrekturfaktors müssen folgende Größen/Informationen berücksichtigt werden:

- Probenvorverdünnung
- Eingesetztes Ausgangsvolumen der Probe für die DNA-Extraktion
- Anteil des DNA-Extrakts aus dem Gesamteluat, der in die PCR eingesetzt wird

Tab. 12: Beispiel-Berechnung des Korrekturfaktors K bei einer Probenaufbereitung mit dem Maxwell® RSC (Promega)

Beschreibung	Faktor
300 µl Probeneinsatz in die Extraktion*, eluiert in 60 µl Endvolumen	Kein Faktor
5 µl DNA-Extrakt-Einsatz in PCR (gesamtes Eluat 60 µl = 1/12)	x 12
300 µl Probeineinsatz auf 1 ml hochgerechnet*	x 3,3
Korrekturfaktor K für <i>Pneumocystis jirovecii</i>	40

*Ergebnis soll auf 1 ml BAL bezogen sein

Hinweis: Für weitere Informationen zur Quantifizierung der Proben wenden Sie sich bitte an pcr@r-biopharm.de.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für bronchoalveoläre Lavage (BAL) validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii* zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (mt LSU; large subunit) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 203 extrahierte Proben (BAL) mit dem RIDA[®]GENE Pneumocystis jirovecii Test und einer in-house real-time PCR in einem Labor in Deutschland untersucht.

Tab. 13: Korrelation der *Pneumocystis jirovecii* Ergebnisse mit der RIDA[®]GENE Pneumocystis jirovecii multiplex real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR		Insgesamt	Bemerkungen
		Positiv	Negativ		
RIDA [®] GENE Pneumocystis jirovecii	Positiv	28	2 ^{b)}	30	Pos. Übereinstimmung: 91.8 %
	Negativ	3 ^{a)}	170	173	Neg. Übereinstimmung: 98.6 %
	Insgesamt	31	172	203	

a) Drei (3) Proben befinden sich unter der Nachweisgrenze des RIDA[®]GENE Pneumocystis jirovecii Tests mit einem Cp-Wert > 35 im Referenz-in-house real-time PCR Test

b) Zwei (2) Proben befinden sich unter der Nachweisgrenze des Referenz-in-house real-time PCR Tests mit einem Cp-Wert > 33 im RIDA[®]GENE Pneumocystis jirovecii Test

13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®] GENE *Pneumocystis jirovecii* multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA Kopien/Reaktion für *Pneumocystis jirovecii*.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von *Pneumocystis jirovecii* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

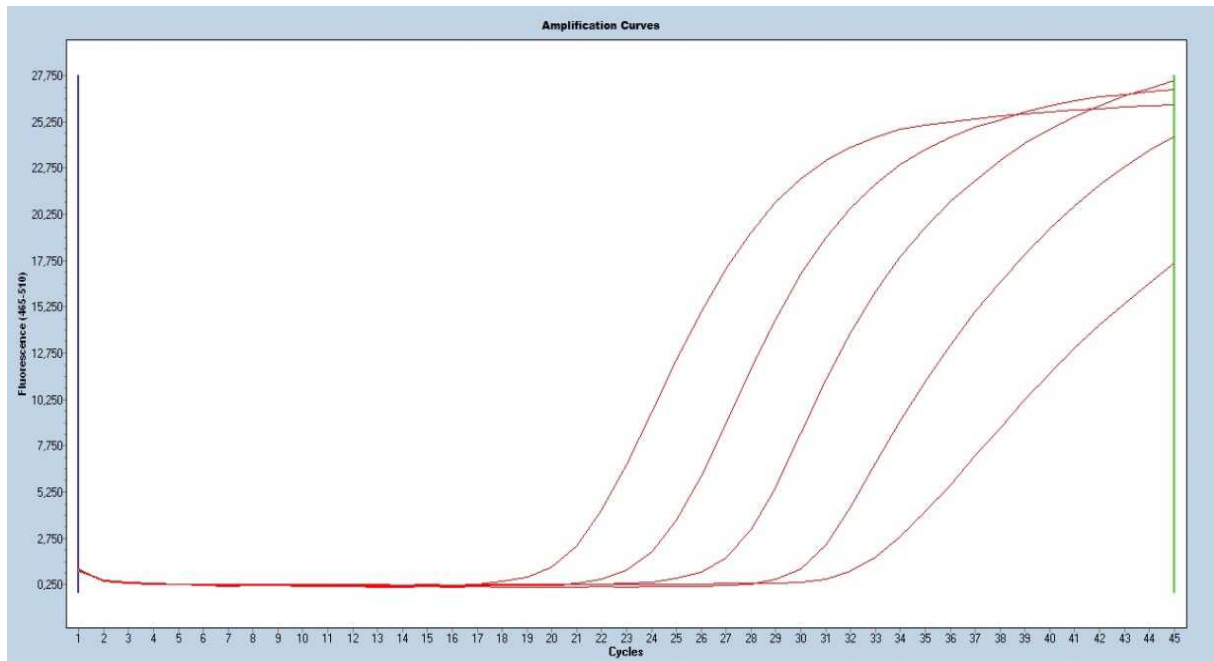


Abb. 3: Verdünnungsreihe *Pneumocystis jirovecii* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der DNA-Extraktion und dem DNA-Gehalt.

13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Pneumocystis jirovecii*. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 14, * Nachweis mittels Sequenzabgleich).

Tab. 14: Kreuzreaktivitätstestung










<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Rhizomucor pusillus</i>	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	Coxsackie B4, human	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	Cytomegalovirus, human	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Scedosporium apiospermum</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Doratomyces microsporus</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Scedosporium prolificans</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	-	Epstein-Barr-Virus, strain B95-8	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	<i>Fusarium solani</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Parainfluenza virus 1, human strain C35	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Helicobacter felis</i>	-	Parainfluenza virus 2, human, strain Greer	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Herpes simplex virus 1, strain McIntyre	-	Parainfluenza virus serotype 3	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Herpes simplex virus 2, strain MS	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	Human <i>Metapneumovirus</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Cladosporium</i> spp	-	Influenza virus, infectious A/PR/8/34	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Coronavirus 229E, human	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Rhinovirus, genogroup A, human	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-07-22	4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9.2 Herstellung des PCR-Mix 9.3 Geräteeinstellungen 10. Qualitätskontrolle

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. Linssen CF *et al.* Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage fluid samples 2006, 55: 1229-1235.
2. Tia T *et al.* A highly sensitive novel PCR assay for the detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients 2012, 18: 598-603.
3. Borde JP *et al.* Aktuelle Diagnostik und Therapie der *Pneumocystis-jirovecii*-Pneumonie. Dtsch Med Wochenschr 2011, 136: 1426-1430.
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Pneumocystis pneumonia* Statistics 2012.
5. Krajicek BJ *et al.* *Pneumocystis pneumonia*: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. Clin Chest Med 2009, 30: 265-278.