



Validering av ett automatiserat system för multiplex detektion av luftvägspatogener som orsakar samhällsförvärvad pneumoni

Validation of an automated system for multiplex detection of respiratory pathogens causing community acquired pneumonia

Författare: Ina Grönqvist

Vårterminen 2018

Examensarbete: Grundnivå (G2E), 15 högskolepoäng

Huvudområde: Biomedicinsk laboratorievetenskap

Biomedicinska analytikerprogrammet, inriktning laboratoriemedicin

BMLV, Examensarbete, 15 högskolepoäng

Institutionen för hälsovetenskaper, Örebro Universitet.

Handledare: Paula Mölling, Molekylärbiolog, Docent

Marita Ekström, Biomedicinsk analytiker

Laboratoriemedicinska kliniken, Universitetssjukhuset Örebro

Examinator: Malin Prenkert, Lektor, Örebro Universitet

ABSTRACT

Community-acquired pneumonia means that the patient acquired the infection in society and examples of bacteria that causes this infection are *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* and *Legionella pneumophila*. These bacteria are naturally resistant against some antibiotics which makes it important to identify them to administer the right treatment. The aim was to evaluate if a new multiplex analysis, b-CAP assay, on BD MAX™ System could reliably detect and identify *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci* and *M. pneumoniae*. Clinical samples from upper and lower respiratory tracts were analysed on the BD MAX™ and the results were compared with in-house real-time polymerase chain reaction or another laboratory. Dilutions of *C. pneumoniae* were analysed to compare sensitivity of the BD MAX™ and in-house method. To evaluate the assay's detection limit of *L. pneumophila* a viable count was made. Sensitivity and specificity was 100% for *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *L. pneumophila*. For *C. psittaci* sensitivity was 80% and specificity 91%. The analysed dilutions of *C. pneumoniae* showed no difference in lowest detection limit between the methods. For *L. pneumophila* the detection limit was 10 colony forming units/ml. The results showed lower cycle thresholds on BD MAX™ compared to the in-house method which could imply a more effective amplification. In conclusion, b-CAP assay had a high sensitivity and specificity for all targets except *C. psittaci*. However only a few samples were analysed and not during optimal conditions which is why more samples must be analysed for *C. psittaci*.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, multiplex real-time PCR

ABSTRAKT

Samhällsförvärd pneumoni innebär att patienten smittats ute i samhället och exempel på bakterier som kan orsaka denna infektion är *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* och *Legionella pneumophila*. Bakterierna är naturligt resistenta mot vissa antibiotika vilket gör det viktigt för att identifiera dessa för att administrera rätt behandling. Syftet var att undersöka om en ny multiplexanalys, b-CAP assay, på BD MAX™ System kunde detektera och identifiera *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci* och *M. pneumoniae* på ett tillförlitligt sätt. Övre och nedre luftvägsprover analyserades på BD MAX™ och resultaten jämfördes med in-house realtids polymerase chain reaction (PCR) eller annat laboratorium. En spädningsserie av *C. pneumoniae* analyserades för att jämföra sensitivitet hos BD MAX™ och in-house realtids PCR. För *L. pneumophila* genomfördes viable count för att undersöka analysens detektionsnivå. Sensitivitet och specificitet var 100% för *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* och *L. pneumophila*. För *C. psittaci* var sensitiviteten 80% och specificitet 91%. Ingen skillnad i lägsta detektionsnivå sågs mellan BD MAX™ och in-house metoden när spädningsserien av *C. pneumoniae* analyserades. Detektionsnivån för *L. pneumophila* var 10 colony forming units/ml. Resultaten visade på lägre cycle threshold värden hos BD MAX™ i jämförelse med in-house realtids PCR vilket kan betyda en mer effektiv amplifiering. Slutsatsen som kunde dras var att b-CAP assay hade en hög sensitivitet och specificitet för alla patogener förutom *C. psittaci*. Dock analyserades endast ett fåtal prover för detta agens och ej under optimala förhållanden vilket är varför fler prover bör analyseras för *C. psittaci*.

Nyckelord: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, multiplex realtids PCR

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION.....	1
Samhällsförvärd och atypisk pneumoni	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	2
<i>Chlamydophila psittaci</i>	2
<i>Legionella pneumophila</i>	2
Polymerase Chain Reaction	3
<i>Realtids PCR</i>	4
<i>Multiplex PCR</i>	4
Syfte	5
Frågeställning	5
MATERIAL OCH METOD	6
Provmaterial	6
Etiska överväganden	7
BD MAX™ b-CAP assay	7
In-house realtids PCR	7
<i>DNA extraktion</i>	7
<i>Realtids PCR LightCycler®</i>	7
Spädningsserie	9
Kontroll	9
Statistik	9
RESULTAT	10
Analys av patientprover	10
Spädningsserie	13
DISKUSSION	16
Slutsats	20
REFERENSER	21

INTRODUKTION

Samhällsförvärd och atypisk pneumoni

Pneumoni innebär en infektion i lungorna och kallas i vardagligt språk för lunginflammation. Det är den infektionssjukdom med högst mortalitet i Sverige då dödligheten är ca 5% hos patienter på infektionsavdelningar (1). Infektioner kan antingen vara samhällsförvärdade då patienten smittats i samhället eller vårdrelaterade om patienten smittats på exempelvis en vårdavdelning (1).

Intracellulära bakterier är en vanlig orsak till samhällsförvärd pneumoni (2). Det som är speciellt med intracellulära bakterier är att de interagerar och förökar sig i celler. Förökningen sker i olika typer av värdceller då bakterierna ställer krav på olika förhållanden. Efter förökning lyseras cellen och bakterierna kan infektera nya celler (3). Pneumoni orsakad av intracellulära bakterier benämns atypisk pneumoni (2). Exempel på dessa bakterier är *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* och *Legionella pneumophila* (2). Det är viktigt att identifiera dessa bakterier för att sätta in rätt behandling till patienten då de är naturligt resistenta mot vissa typer av cellväggshämmande antibiotika (2).

Mycoplasma pneumoniae

M. pneumoniae är en liten bakterie som saknar cellvägg vilket innebär en naturlig resistens mot antibiotika som hämmar cellväggssyntesen, till exempel penicillin (1). Ett ytprotein vid namn P1 möjliggör inbindning av *M. pneumoniae* till cilier och mikrovilli i luftvägarna. Där orsakar bakterien skador på epitelceller och cilier och den kan även leva intracellulärt i epitelcellerna (1). *M. pneumoniae* är en vanlig orsak till samhällsförvärd pneumoni och är vanligare hos yngre än äldre patienter. Infektionen sprids via aerosoler mellan människor (2).

Eftersom *M. pneumoniae* saknar cellvägg är den inte synlig vid rutinfärgningen som är gramfärgning då denna infärgning är beroende av bakteriens cellvägg (4). Metoder för antigen-detektion har utvecklats men har en låg sensitivitet (4). I dagsläget används oftast polymerase chain reaction (PCR) baserade metoder för diagnostik. Fördelarna är främst tidseffektivitet och en mer känslig metod då bakterien kan detekteras tidigare i sjukdomsförloppet. Realtids PCR är den metod som har högst sensitivitet (4). Genen som kodar för P1 adhesin protein kan användas som målsekvens vid PCR baserade metoder (4).

Chlamydophila pneumoniae

C. pneumoniae är en intracellulär bakterie som kräver levande celler för energi och förökning (1). Till strukturen liknar den gramnegativa bakterier och klassificeras därför som en gramnegativ bakterie (5). Bakterien smittar via aerosoler mellan människor och orsakar mild pneumoni och i sällsynta fall allvarlig pneumoni. Infektionen kan ofta vara asymtomatisk. *C. pneumoniae* orsakar skador på luftvägsepitel och lyserar infekterade celler (2).

Infektion med *C. pneumoniae* diagnosticeras ofta med PCR baserade metoder då bakterien kräver en levande cellkultur för odling (5). Realtids PCR används ofta på grund av fördelarna jämfört med konventionell PCR. Det finns flera kommersiella PCR kit tillgängliga för detektion av *C. pneumoniae*. En gen som används som målsekvens är outer membrane protein A (*ompA*) genen (4). Serologiska metoder finns för detektion av bakterien men dessa metoder har haft varierande resultat (5).

Chlamydophila psittaci

C. psittaci är likt *C. pneumoniae* en intracellulär bakterie som kräver levande celler för överlevnad och förökning (1). Liksom hos *C. pneumoniae* är strukturen hos *C. psittaci* lik den hos gramnegativa bakterier (5). Bakterien orsakar psittakos, även kallat papegojsjuka, med influensaliknande symtom som feber, frossa, huvudvärk och torrhosta (1,6). Smittan härstammar från infekterade fåglar och infekterar människor via luftburen smitta. Infektionen kan vara livshotande och mortaliteten ligger på ca 1% (1).

För diagnostik av *C. psittaci* infektion används sällan odling då denna bakterie liksom *C. pneumoniae* kräver levande celler. Smittorisken för laboratoriepersonal är även hög vid odling av *C. psittaci* (5). Metoder för detektion av antikroppar mot *C. psittaci* har utvecklats (5). PCR baserade metoder finns tillgängliga och Realtids PCR kan vara ett användbart diagnostiskt hjälpmedel (6). Exempel på gener som kan användas som målsekvenser är genen som kodar för envelope protein B (*envB*) (6) och *ompA*-genen hos *C. psittaci* (7).

Legionella pneumophila

L. pneumophila är en intracellulär gramnegativ stav som orsakar legionärsjuka, en typ av pneumoni (2). Bakterien kan orsaka allvarlig infektion med en mortalitet mellan 5 och 30% (1). Den förekommer framför allt i varmvattensystem med en för låg temperatur vilket leder till att bakterierna anrikas. Smitta sker via inandning av aerosoler från vattenkällor innehållandes *L. pneumophila* (1). Bakterien infekterar efter inandning främst alveolära

makrofager vilket orsakar infektionens symtom. Infektion med *L. pneumophila* drabbar främst patienter över 50 år (2).

L. pneumophila kan odlas på buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar för diagnostik (4). Bakterien växer relativt långsamt och därför lämpar sig molekylär-diagnostiska metoder för en snabb diagnostik då en allvarlig pneumoni kan utvecklas (1). PCR baserade metoder har även en hög sensitivitet. En vanlig gen som används som målsekvens vid PCR baserade metoder är macrophage infectivity protein (*mip*) genen (4). Inom diagnostiken för *L. pneumophila* finns även kommersiella immunoassays för detektion av antigen i urin tillgängliga (4).

Polymerase Chain Reaction

PCR är en metod som används i stor utsträckning på molekylärbiologiska laboratorier. Det är en användbar metod inom mikrobiologisk diagnostik då bakterier och virus kan detekteras och identifieras effektivt. Metoden går ut på att en specifik nukleinsyrasekvens i deoxyribonukleinsyra (DNA) amplifieras, dvs kopieras till en detekterbar mängd (8).

Reaktionen sker i tre steg som tillsammans utgör en cykel som upprepas ett bestämt antal gånger (8).

Dubbelsträngat DNA agerar som templat vid denna reaktion och med hjälp av sekvensspecifika primrar kan en bestämd sekvens amplifieras. Dessa primrar består av nukleinsyror och är komplementära till området i DNA strängen där målsekvensen är belägen (8). För att primrarna ska kunna hybridisera till målsekvensen måste dubbelsträngat DNA denatureras till enkelsträngat DNA. Denatureringen är första steget i PCR reaktionen och sker via upphettning till 94-96°C (8).

Nästa steg i PCR reaktionen är hybridisering vilket är då primrarna binder till målsekvensen. Detta sker oftast vid en temperatur mellan 50-70°C beroende på primrarnas optimala temperatur (8). Det är viktigt att primrarna är specifika för målsekvensen eftersom de avgör vilken sekvens i DNA som amplifieras i nästkommande steg (8).

Det sista steget i en PCR cykel är amplifieringen och här sker syntesen av en ny DNA sträng. Syntesen utgår ifrån de hybridiserade primrarna som förlängs genom addering av deoxynucleotide phosphates (dNTP) med hjälp av enzymet DNA polymeras (8). Detta steg sker vid en temperatur mellan 68-72°C. Efteråt har det bildats två kopior utifrån det ursprungliga templatet (8).

Realtids PCR

Realtids PCR är en tillämpning på PCR reaktionen där en signal i form av fluorescens mäts under amplifieringen (8). En amplifiering av målsekvensen leder till en fluorescenssignal som detekteras av instrumentet (9). Den ökade mängden fluorescens under amplifieringen ger upphov till en exponentiell kurva (8). Hur tidigt kurvan uppkommer beror på mängden mål-DNA i ursprungsprovet. Då mycket mål-DNA finns i provet uppkommer kurvan tidigare än om provet innehåller en mindre mängd mål-DNA (8). För att avgöra om ett prov är positivt anges ett tröskelvärde, en nivå av fluorescens som måste överstigas. Threshold cycle (C_T) är ett begrepp som anger den PCR cykel då den exponentiella kurvan korsade tröskeln (8).

För detektion av nukleinsyran vid realtids PCR kan fluorescerande molekyler specifika för dubbelsträngat DNA som SYBR Green eller prober inmärkta med en fluorescerande molekyl användas (10). Vid användning av prober ökar analysens specificitet då proben måste hybridisera till målsekvensen för att fluorescens ska genereras (8).

TaqMan är ett exempel på en prob som används vid analys med realtids PCR. Proben är uppbyggd av en oligonukleotid med en fluorescerande molekyl i 5' änden och en quencher i 3' änden (8). En quencher är en molekyl som förhindrar att den fluorescerande molekylen i 5' änden avger fluorescens (8).

Metoden utnyttjar en naturlig exonukleas aktivitet hos DNA polymeras vilket leder till nedbrytning av proben i nukleotider då DNA syntesen pågår (8). Nedbrytningen av proben leder till separation av den fluorescerande molekylen och quencher. När dessa molekyler är separerade från varandra kan den fluorescerande molekylen avge fluorescens som sedan kan mätas i instrumentet (8).

Multiplex PCR

Multiplex PCR är en annan tillämpning på PCR-metoden där fler än ett primerpar används för detektion av nukleinsyrasekvenser (8). I denna tillämpning amplifieras flera målsekvenser samtidigt (8). Detta är användbart inom mikrobiologisk diagnostik då flera bakterier eller virus kan detekteras samtidigt (8). Utifrån multiplex PCR har flera paneler utvecklats för patogener specifika för organsystem som exempelvis mag-tarmkanalen och luftvägarna (9). Det finns även en fördel med metoden då en internkontroll kan tillsättas i vardera prov för att kontrollera att amplifieringsreaktionen var lyckad och ingen inhibition föreligger (8). Den sekvens som används som internkontroll ska alltid detekteras och negativa resultat för

sekvensen tyder på en misslyckad PCR reaktion (5). En positiv internkontroll gör provresultaten mer pålitliga vid ett negativt resultat vilket då inte tolkas som en misslyckad PCR reaktion utan en avsaknad av målsekvensen (5).

Idag vid Universitetssjukhuset Örebro analyseras prover med en in-house realtids PCR för verifiering av *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae*. Eventuella positiva *L. pneumophila* verifieras med odling och *C. psittaci* skickas till annat laboratorium.

Syfte

Syftet är att undersöka om en ny multiplexanalys, b-CAP assay (Biolegio, Nijmegen, Nederländerna), på BD MAX™ System (Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) kan detektera och identifiera *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci* och *M. pneumoniae* på ett tillförlitligt sätt.

Frågeställning

Kan b-CAP assay på BD MAX™ System identifiera *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci* och *M. pneumoniae* på ett tillförlitligt sätt med tillräcklig känslighet?

MATERIAL OCH METOD

Provmaterial

Övre och nedre luftvägsprover från förvaring i -70°C användes för multiplex analys med BD MAX™ b-CAP assay och in-house realtids PCR. Övre luftvägsprover inkluderade svalg- och nasopharynxprover. Nedre luftvägsprover inkluderade sputum, trakealsekret och bronkoalvelärt lavage (BAL). Tabell I visar antal positiva prover som analyserades på BD MAX™ för vardera agens och den metod som resultatet av analysen jämfördes med (Tabell I).

Tabell I. Antal positiva prover för vardera agens och metod som resultatet jämfördes med.

Agens	Antal prover	Jämförelse av resultat ^a
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	23	In-House realtids PCR
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	7	In-House realtids PCR
<i>Legionella pneumophila</i>	7	Odling/PCR
<i>Chlamydophila psittaci</i>	5	BD MAX™ ^b

^a Polymerase Chain Reaction (PCR)

^b Analys från annat laboratorium

Utöver de positiva proverna analyserades nio negativa luftvägsprover och en pool bestående av 18 negativa luftvägsprover. Prover med otillräcklig mängd och prover som blev ogiltiga på BD MAX™ System späddes 1/10 med phosphate-buffered saline (PBS).

Till spädningsserie användes ett positivt prov för *C. pneumoniae* och *L. pneumophila* odlade på BCYE agar innehållandes Legionella CYE Agar Base (0,2% aktiverat kol, 1% jästextrakt, 1,3% agar (Oxoid, Hampshire, Storbritannien)) och Legionella BCYE Growth Supplement SR0110 (1% Buffert/Kaliumhydroxid, 0,025% Järn (III) Pyrofosfat, 0,04% L-cystein väteklorid, 0,1% α -ketoglutarat (Oxoid, Hampshire, Storbritannien)). Vid tillverkning av en 4-plex kontroll användes sex positiva prover för *C. pneumoniae* som poolades ihop, ett positivt prov för *C. psittaci*, en positiv kontroll för *M. pneumoniae* och *L. pneumophila* odlade på BCYE agar.

Etiska överväganden

Proverna som användes var tagna i diagnostiskt syfte och kunde ej kopplas ihop med patientdata.

BD MAX™ b-CAP assay

Luftvägsproverna förbehandlades via tillsättning av 20µl Proteinase K (18 mg/ml) till 500µl prov och inkuberades därefter 30 minuter i 56°C värmeblock.

BD MAX™ Exk™ DNA-1 (Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) användes för analys på BD MAX™ System. Proverna tillsattes i BD MAX™ DNA Sample Buffer Tube. I BD MAX™ DNA Reagent Strip tillsattes BD MAX™ Extraction Tubes och därefter tillsattes BD MAX™ DNA MMK (SPC) (Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) och b-CAP tubes (Biolegio, Nijmegen, Nederländerna). Analysen genomfördes enligt instruktioner från PAMM Laboratories (11).

In-house realtids PCR

In-house realtids PCR användes för att detektera *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae* i övre och nedre luftvägsprover. Kontroller som inkluderades var ett positivt patientprov för *M. pneumoniae* för kontroll av DNA extraktion, en negativ kontroll, en positiv DNA kontroll för *M. pneumoniae* samt en positiv DNA kontroll för *C. pneumoniae*.

DNA extraktion

DNA extraherades från 200µl luftvägsprov med MagDEA® Dx SV Kit (Precision System Science Co., Ltd, Matsudo, Japan) i magLEAD® 12gc (Precision System Science Co., Ltd, Matsudo, Japan) och eluerades i en volym på 50µl.

Realtids PCR LightCycler®

För detektion av *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae* används fyra olika primrar, två för vardera agens, och två TaqMan prober med olika flouororer (Tabell II).

Tabell II. Primrar och TaqMan prober för detektion av *Mycoplasma pneumoniae* och *Chlamydophila pneumoniae* för in-house realtids polymerase chain reaction.

Agens	Primer/Prob	Sekvens (5'-3') ^a
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Primer MPTM1	CCAACCAAACAACAACGTTCA
	Primer MPTM2	ACCTTGACTGGAGGCCGTTA
	Probe MPprobe	FAM-TCAATCCGAATAACGGTGACTTCT TACCACTG-BHQ
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Primer CPTM1	CATGGTGTCAATTCGCCAAGT
	Primer CPTM2	CGTGTCGTCCAGCCATTTTA
	Probe CPprobe	HEX-TCTACGTTGCCTCTAAGAGAAAAC TTCAAGTTGGA-BHQ

^a Carboxyfluorescein (FAM); Hexachloro-Fluorescein (HEX); Black Hole Quencher (BHQ)

Reaktionsmixen för realtids PCR innehöll samtliga primrar med slutkoncentrationerna i 20µl reaktionsvolym: 0,7µM av primrarna MPTM1, MPTM2 och CPTM1 samt 0,5µM av CPTM2. TaqMan proberna för detektion hade slutkoncentrationerna 0,1µM för både MPprobe och CPprobe.

Förutom primrar och prober innehöll reaktionsmixen samtliga reagens från LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland): 1x Mastermix Hybr. Probes 1,5mM MgCl₂, 25U/ml Uracil-DNA Glycosylase och PCR Grade H₂O.

Till glaskapillärer LightCycler® Capillaries (20µl) (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) tillsattes 15µl av PCR reaktionsmixen och 5µl extraherat DNA. Proverna centrifugerades sedan med LC Carousel Centrifuge (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland).

Proverna analyserades med realtids PCR i LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) enligt följande program: 40°C i 10 minuter, 95°C i 10 minuter följt av 45 cykler med 95°C i 5 sekunder, 60°C i 15 sekunder och 72°C i 5 sekunder. Efter 45 cyklar kylades proverna i 40°C i 30 sekunder.

Spädningsserie

Ett positivt prov för *C. pneumoniae* späddes 1/10 i sex steg ner till 1/1 000 000 med PBS.

Spädningarna analyserades sedan i LightCycler® 2.0 samt BD MAX™ System för jämförelse av sensitiviteten.

Odlade *L. pneumophila* användes till en viable count för att bestämma detektionsnivån på BD MAX™ System. Spädningsserien utgick från McFarland 0.5 (ca $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml) och provet späddes 1/10 i åtta steg ner till 1/100 000 000. Endast prover från spädning 1/1000 till 1/100 000 000 odlades ut på BCYE agar och analyserades med b-CAP assay på BD MAX™ System. Plattorna inkuberades i 37°C i fyra dygn och därefter räknades antal kolonier.

Kontroll

En 4-plex positiv kontroll för samtliga agens *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* och *L. pneumophila* tillverkades. Kontrollen innehöll ett positiv *M. pneumoniae* kontroll spädd 1/200, en pool av sex positiva *C. pneumoniae* prover spädd 1/20, ett positivt prov för *C. psittaci* spädd 1/20 samt odlade *L. pneumophila* spädda 1/4000 med utgångspunkt McFarland 0,5.

Statistik

Utifrån resultaten beräknades sensitivitet och specificitet för respektive agens. För *M. pneumoniae* och *C. pneumophila* användes in-house realtids PCR som referens. Vid beräkning av sensitivitet för *C. psittaci* användes BD MAX™ vid annat laboratorium som referens. Beräkning av sensitivitet för *L. pneumophila* utgick från resultat vid odling eller PCR på annat laboratorium. Specificiteten beräknades för respektive agens med utgångspunkt från de tio negativa luftvägsprover som analyserades.

Medelvärde av C_T-värden beräknades för *M. pneumoniae* och *C. pneumophila* för en jämförelse mellan BD MAX™ och in-house realtids PCR.

RESULTAT

Analys av patientprover

Analys av patientproverna resulterade i 22 och 21 positiva *M. pneumoniae* på BD MAX™ respektive in house (Tabell III). Då positiva *C. pneumoniae* prover analyserades var resultatet sex positiva i båda analysmetoderna (Tabell IV). Fem positiva prover för *C. psittaci* från annat nationellt laboratorium analyserades på BD MAX™ och fyra av dessa blev positiva (Tabell V). Alla sju positiva *L. pneumophila* blev positiva vid analys med b-CAP assay på BD MAX™. De tio negativa proverna som inkluderades blev alla negativa vid analys (Tabell VI).

Tabell III. Resultat vid analys av 33 prover (varav 23 positiva och tio negativa) för *Mycoplasma pneumoniae* på BD MAX™ och in-house realtids polymerase chain reaction.

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	BD MAX	In-House
Positiv	22	21
Negativ	11	12

Tabell IV. Resultat vid analys av 17 prover (varav sju positiva och tio negativa) för *Chlamydophila pneumoniae* på BD MAX™ och in-house realtids polymerase chain reaction.

<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	BD MAX	In-House
Positiv	6	6
Negativ	11	11

Tabell V. Resultat vid analys av 15 prover (varav fem positiva och tio negativa) för *Chlamydophila psittaci* på BD MAX™. Resultatet jämfördes med BD MAX™ analys vid annat laboratorium.

<i>Chlamydophila psittaci</i>	BD MAX	Annat laboratorium
Positiv	4	5
Negativ	11	-

Tabell VI. Resultat vid analys av 17 prover (varav sju positiva och tio negativa) för *Legionella pneumophila* på BD MAX™.

<i>Legionella pneumophila</i>	BD MAX	Annat laboratorium ^a
Positiv	7	7
Negativ	10	-

^aTvå av proverna var positiva vid analys med BD MAX™ vid annat laboratorium och fem prover var positiva vid odling och eller polymerase chain reaction.

Sensitivitet och specificitet beräknades för b-CAP assay på BD MAX™ med in-house realtids PCR som referens för *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae*. Sensitiviteten var 100% och specificiteten 100% för båda agens. För *C. psittaci* användes annat nationellt laboratorium som referens och sensitiviteten var 80% och specificiteten 91%. Vid beräkning av *L. pneumophila* var odling eller PCR vid annat laboratorium referensen och resultatet blev 100% för sensitivitet samt specificitet.

Tabell VII visar C_T-värdena vid analys av positiva prover för *M. pneumoniae* samt *C. pneumophila* vid analys på BD MAX™ och in-house realtids PCR. Medelvärdet av C_T-värdena vid analys av *M. pneumoniae* var 25,9 och 27,6 för BD MAX™ respektive in-house. Vid analys av *C. pneumophila* var medelvärdena 25,0 på BD MAX™ och 28,1 vid in-house realtids PCR (Tabell VII).

Tabell VII. Positiva prover för *Mycoplasma pneumoniae* (Mpn) och *Chlamydomphila pneumophila* (Cpn) och threshold cycle värden vid analys med BD MAX™ och in-house realtids polymerase chain reaction.

Prov	BD MAX	In-House
Mpn 1	19,4 ^a	18,43
Mpn 2	30	32,17
Mpn 3	19,7 ^a	19,49
Mpn 4	17,9 ^a	17,16
Mpn 5	21,2	24,06
Mpn 6	24,3	26,28
Mpn 7	39,5	Negativ

Mpn 8	36,3	37,67
Mpn 9	23,6	28,3
Mpn 10	22,9	25,82
Mpn 11	22,4	24,28
Mpn 12	30,7	33,51
Mpn 13	22,7	24,89
Mpn 14	22	24,24
Mpn 15	Negativ	Negativ
Mpn 16	21,6	23,7
Mpn 17	34,7	35,56
Mpn 18	27,7	31,43
Mpn 19	22,8	23,89
Mpn 20	22,1	22,76
Mpn 21	29,1	30,95
Mpn 22	40,3	>40
Mpn 23	32,2	34,5
Cpn 1	19,9	24,49
Cpn 2	Negativ	Negativ
Cpn 3	21,1	23,12
Cpn 4	25,5	30,27
Cpn 5	25,3	26,64
Cpn 6	23,7	27,56
Cpn 7	34,3	36,69

^a Spädd 1/10

Tabell VIII presenterar C_T-värden vid analys av positiva *C. psittaci* och *L. pneumophila* på BD MAX™. Värdena jämfördes med resultat från annat laboratorium antingen i form av C_T-värden eller endast positivt resultat (Tabell VIII).

Tabell VIII. Positiva prover för *Chlamydophila psittaci* (Cps) och *Legionella pneumophila* (Lpn) och threshold cycle (C_T) värden vid analys på BD MAX™ samt vid annat laboratorium.

Prov	BD MAX	Annat laboratorium ^b
Cps 1	36,3	33,9
Cps 2	Negativ	33,4
Cps 3	31,1	30,3
Cps 4	25,6	25,2
Cps 5	28	28
Lpn 1	25,1	24,5
Lpn 2	33,6	27,9
Lpn 3	23,3	Positiv ^{cd}
Lpn 4	33,7	Positiv ^c
Lpn 5	44	Positiv ^c
Lpn 6	19,9 ^a	Positiv ^d
Lpn 7	25,8 ^a	Positiv ^d

^a Spädd 1/10

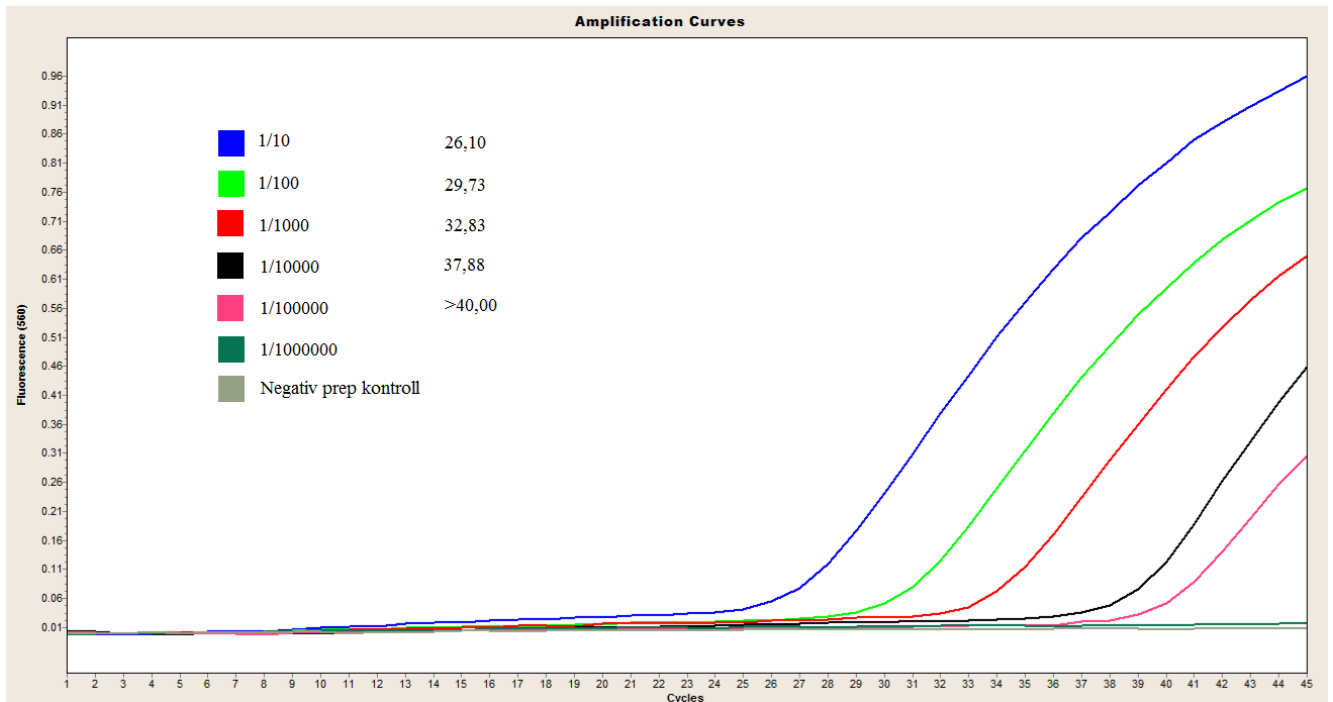
^b Prover med C_T-värden var positiva på BD MAX™ vid annat laboratorium

^c Positiv vid polymerase chain reaction

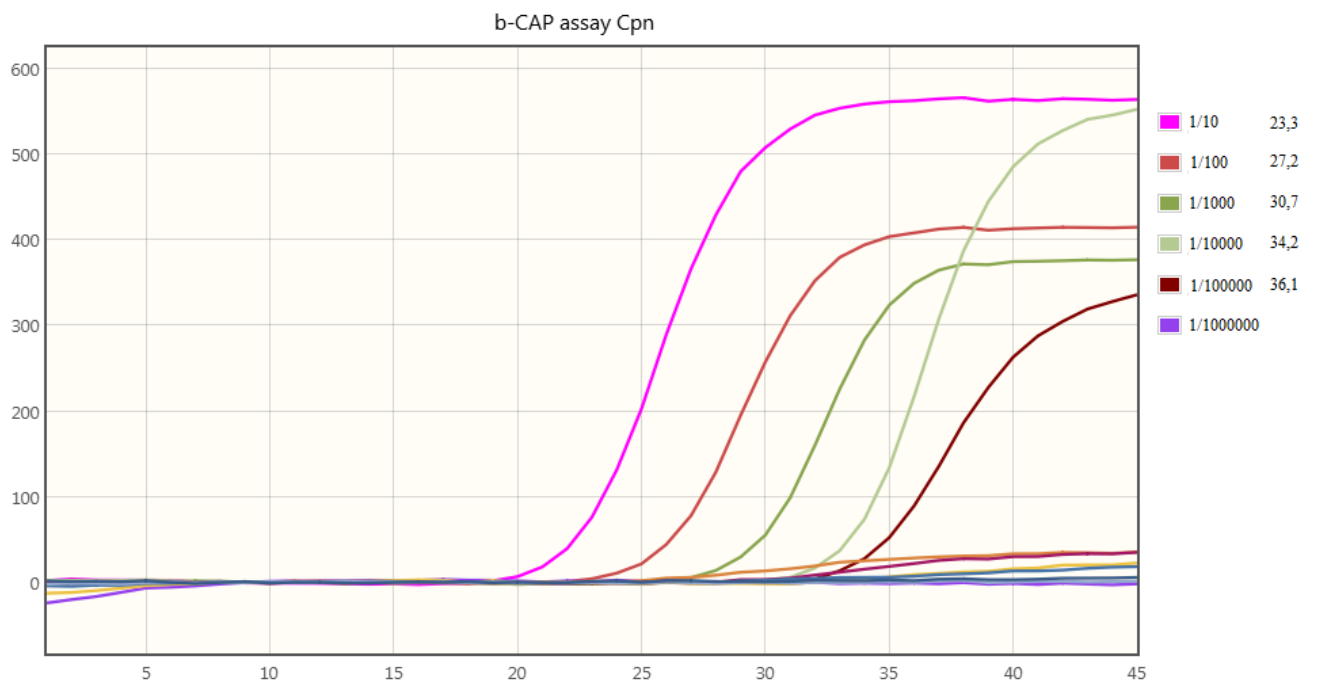
^d Positiv vid odling

Spädningsserie

Analys av spädningsserien av ett positivt prov för *C. pneumoniae* på in-house realtids PCR resulterade i detektion ner till spädning 1/100 000 (Figur 1). På BD MAX™ detekterades provet också ner till spädning 1/100 000 (Figur 2).

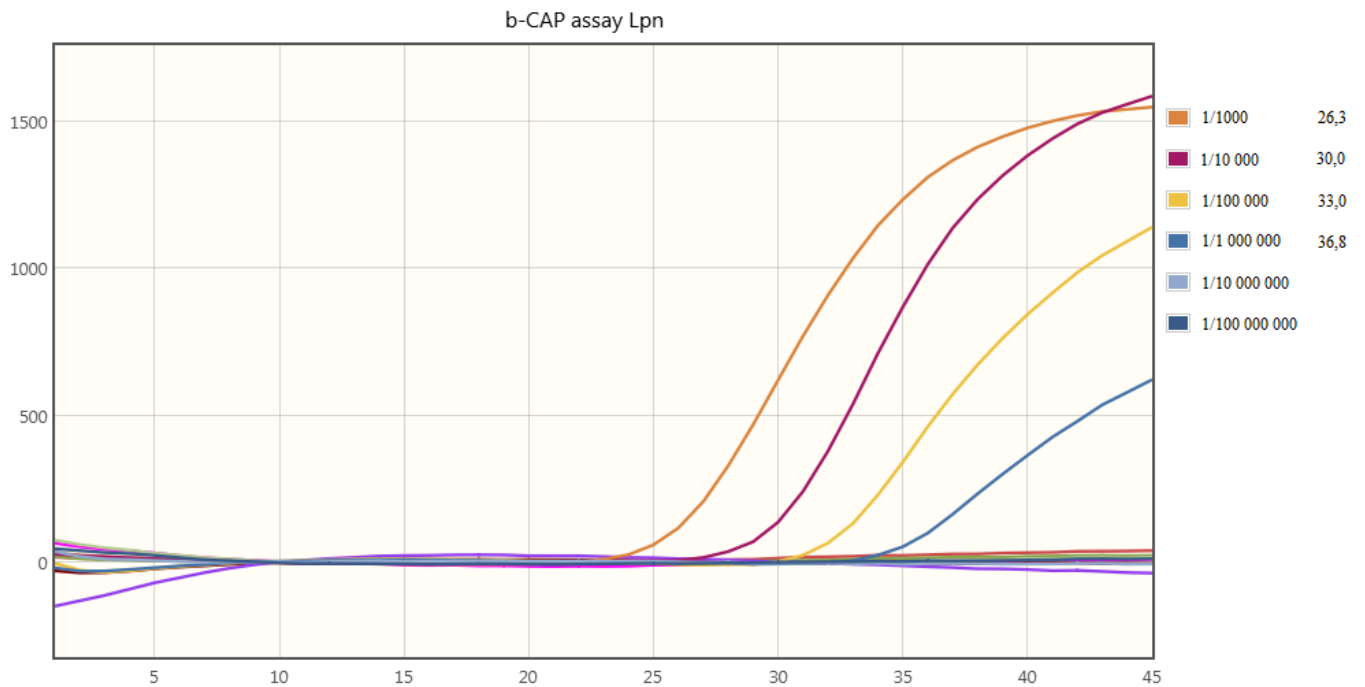


Figur 1. Spädningsserie av positivt prov för *Chlamydomphila pneumoniae* analyserad på LightCycler® 2.0 med threshold cycle värden. En negativ kontroll inkluderades. Mängden fluorescens är på y-axel och antal cykler är på x-axeln.



Figur 2. Spädningsserie av positivt prov för *Chlamydomphila pneumoniae* analyserad på BD MAX™ med threshold cycle värden. På y-axel är mängden fluorescens och på x-axeln är antal cykler.

Resultatet av spädningsserien av *L. pneumophila* på BD MAX™ var att bakterien detekterades ner till spädning 1/1 000 000 (Figur 3). Detta motsvarade 10 CFU/ml då viable count genomfördes. På BCYE agar med spädningar 1/10 000 000 och 1/100 000 000 växte inga kolonier.



Figur 3. Spädningsserie för bestämning av detektionsgränsen för *Legionella pneumophila* på BD MAX™ med mängd fluorescens på y-axel och antal cykler på x-axeln.

DISKUSSION

Utifrån resultaten av patientproverna på BD MAX™ beräknades sensitivitet och specificitet för vardera agens. Sensitiviteten och specificiteten för *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae* var 100%. En sensitivitet på 100% innebär att alla prover som var positiva på in-house realtids PCR för dessa två agens även var positiva på b-CAP assay på BD MAX™. Att specificiteten var 100% innebär att alla negativa prover blev negativa vid analys och att inga falskt negativa analysresultat förekom på BD MAX™ i jämförelse med in-house realtids PCR. Sensitiviteten för *C. psittaci* var 80% och specificiteten 91% då ett positivt prov blev negativt. Det provet var positivt vid analys med b-CAP assay på BD MAX™ vid ett annat laboratorium. Orsaken till ett negativt analysresultat kan vara provmängden då endast 350µl fanns och 500µl är den mängd som rekommenderas. Provet, som redan från början hade en låg koncentration, blev då spätt och kan hamnat under detektionsgränsen för *C. psittaci*. Positiva prover för *C. psittaci* hade även tinats vid transport från annat laboratorium och sedan frysts igen vilket kan ha påverkat resultaten. Sensitiviteten och specificiteten för *L. pneumophila* var 100% i jämförelse med odling eller PCR.

Medelvärdet av C_T-värdena beräknades för *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae* på BD MAX™ och jämfördes med in-house realtids PCR. Medelvärdet för *M. pneumoniae* var 25,9 på BD MAX™ och 27,6 på in-house. För *C. pneumoniae* var medelvärdet 25,0 på BD MAX™ och 28,1 på in-house. Båda beräkningarna visar på att C_T-värdet är lägre vid analys på BD MAX™ än vid in-house realtid PCR. Eftersom C_T-värdet anger vid vilken cykel som fluorescensen överstiger tröskelvärdet betyder ett lägre C_T-värde att kurvan korsar tröskeln tidigare än vid ett högt värde (8). Lägre C_T-värden hos BD MAX™ i jämförelse med in-house realtids PCR kan betyda att en mer effektiv amplifiering sker. Det är bra att analysen visar lägre C_T-värden eftersom prover med lägre koncentrationer av DNA, dvs svagt positiva prover, har större sannolikhet att detekteras som positiva. Ett exempel på detta var ett svagt positivt prov för *M. pneumoniae* som inkluderades i analysen. Resultatet blev negativt på in-house realtids PCR och på BD MAX™ blev provet svagt positivt.

När analysen på BD MAX™ utfördes späddes vissa luftvägsprover 1/10 med PBS.

Förklaringen till spädningsen var att resultatet räknades som ogiltigt då den internkontroll som var tillsatt i proverna inte kunde detekteras, trots positivt resultat för agens. Internkontrollen finns tillsatt i reaktionsmixen med syftet att erhålla ett mer tillförlitligt resultat eftersom den fungerar som en kontroll på att PCR reaktionen utförts optimalt (5,8). Den fungerar även som en kontroll på att inga PCR-inhibitorer finns närvarande i de kliniska proverna (12). I en

studie upptäcktes det att 13,6% av sputumproverna hade en fullständigt inhiberad amplifiering av en kontrollsekvens (12). En orsak till de resultat som blev ogiltiga på BD MAX™ då alla dessa prover bestod av sputum, är att detta provmaterial ofta är inhiberande för PCR reaktionen på grund av sin höga viskositet och måste därför spädas eller förbehandlas till en pipetterbar konsistens. En annan förklaring till resultatet kan vara starkt positiva prover för målsekvensen vilket leder till en hämning av kontrollsekvensens amplifiering. I dagsläget späds nedre luftvägsprover 1/10 för analys med in-house realtids PCR. Lösningen till inhiberingen av internkontrollen på BD MAX™ planeras vara en spädning av nedre luftvägsprover 1/10, och att proverna då analyseras både ospätt och efter spädning.

En spädningsserie av ett positivt *C. pneumoniae* analyserades på BD MAX™ och in-house realtids PCR för att jämföra metodernas detektionsnivå. Båda metoderna detekterade målsekvensen ner till spädning 1/100 000. Skillnaden var att BD MAX™ hade lägre C_T-värden för alla spädningar. Resultatet för den lägsta detektionsnivån var 36,1 på BD MAX™ och >40 på in-house realtids PCR. Utifrån C_T-värdena kan BD MAX™ tolkas som en känsligare metod på grund av ett lägre värde och har då detekterat en större mängd målsekvens i provet. Det hade varit intressant att undersöka en spädning mellan 1/100 000 och 1/1 000 000 och se om BD MAX™ kunnat detektera en spädning mer än in-house metoden.

Analys av en spädningsserie av *L. pneumophila* jämfördes med en viable count av bakteriekolonier på BCYE agar. Jämförelsen resulterade i att 10 CFU/ml kunde detekteras på BD MAX™ vid en spädning på 1/1 000 000. Det växte inga kolonier vid ytterligare spädningar och de var även negativa vid analys på BD MAX™. För att undersöka om analysen kan detektera <10 CFU/ml kan flera spädningar göras mellan 1/1 000 000 och 1/10 000 000. Problemet är att man då är nere på så låga nivåer att slumpen avgör om den enstaka bakteriekolonin kommer med i analysen eftersom endast 0,5 ml används.

Vid denna validering analyserades proverna inom BD MAX™ open system vilket tillåter användning av egna primrar och prober för att skraddarsy en egen analys. Det har skapats fler analyser för luftvägsprover på BD MAX™ open system som även har publicerats. Rochetti et al. utvecklade en multiplex-panel för att detektera olika *Mycobacterium* (13). De kom fram till att panelen hade hög sensitivitet och specificitet och möjliggjorde en snabb detektion av bakterien i jämförelse med odling (13). Michthell et al. utvecklade en analys för *Coccidioides immitis* på BD MAX™ open system som orsakar ”Valley fever” med influensaliknande symtom (14). Syftet var att möjliggöra en snabbare diagnostik än odling och samtidigt vara en

analys med hög sensitivitet (14). Fördelen med BD MAX™ var även analysens automatisering som kräver minimalt med manuella steg för laboratoriepersonalen (14). De drog slutsatserna att metoden fungerar som ett komplement till de övriga diagnostiska analyserna och att analysens snabba svar och bekvämlighet var stora fördelar (14). Dalphe et al. testade en analys för *Pneumocystis jirovecii* på BD MAX™ open system vilket är en svamp som kan orsaka pneumoni hos främst immunsupprimerade patienter (15). En jämförelse med en referens Realtids PCR visade ett jämligt resultat med fördelar som smidigare arbetsflöde med få manuella steg (15).

Två andra studier har utvärderat multiplex PCR för bakterier som orsakar nedre luftvägsinfektioner (16,17). Mustafa et al. utvärderade en duplex och en triplex-analys för luftvägspatogener som orsakar samhällsförvärd pneumoni, där triplex-analysen tittade på tre atypiska patogener (16). De såg fördelar både i tid och kostnad för analysen och insåg behovet av en snabb diagnostik av pneumoni (16). Slutsatsen var att multiplex Realtids PCR fungerade som en bra och känsligare metod för att detektera bakterierna än konventionella diagnostiska metoder (16). Gadsby et al. utvecklade två multiplex Realtids PCR för åtta olika bakterier som orsakar nedre luftvägsinfektioner (17). Syftet var att utveckla en analys med hög sensitivitet och möjliggöra en kortare svarstid (17). De såg att analysen hade en högre sensitivitet än odling och att den snabbare analystiden kan leda till bättre val av antibiotika för behandling av patienten (17). En tredje studie av Nummi et al. utvecklade en analys för *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae* där även resistens mot makrolider kunde detekteras (18). Makrolidresistens hos *M. pneumoniae* är ett växande problem i världen och denna analys möjliggjorde detektion av de vanligaste mutationerna i bakteriens 23S ribosomala ribonukleinsyra (rRNA) gen (18). Sensitiviteten och specificiteten för den utvecklade analysen var hög och detektion av makrolidresistens kan vara användbart för att förbättra valet av antibiotika (18). I och med ökande antibiotikaresistens hos flertalet bakterier kan liknande analyser för vanliga resistensmutationer vara användbart i framtiden och speciellt hos svårödlade eller långsamtväxande bakterier.

Något annat som undersöks på multiplex Realtids PCR är möjligheten att analysera för både virus och bakterier samtidigt. En studie av Gowin et al. analyserade prover från barn med misstänkt pneumoni för 33 olika patogener (19). Patogenerna inkluderade virus, svamp och bakterier och de ville utvärdera hur användbart en multiplex analys kan vara för att diagnosticera pneumoni hos barn (19). En orsakande patogen kunde detekteras hos 76% av barnen och de såg att samtidig infektion med virus förekom. De drog slutsatsen att analysen

var mer användbar för att hitta en orsakande patogen hos barnen än de konventionella metoderna som användes (19).

Idag används en in-house Realtids PCR på Universitetssjukhuset Örebro för att verifiera *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae* i luftvägsprover. För verifiering av *L. pneumophila* används odling och vid misstänkt *C. psittaci* skickas proverna till ett annat nationellt laboratorium för analys med b-CAP assay på BD MAX™. Fördelarna med b-CAP assay på BD MAX™ gentemot in-house metoden är fler agens. På BD MAX™ analyseras alla fyra bakterier samtidigt medan på in-house metoden analyseras endast två. En annan fördel är att b-CAP assay analyserar direkt från originalprovet och ingen DNA extrahering krävs. Det leder till en minskning av antalet manuella steg och risken för kontamination minskar.

Syftet med denna validering av metoden är att b-CAP assay på BD MAX™ ska ersätta in-house Realtids PCR för luftvägsprover gällande *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae* på Universitetssjukhuset Örebro. Utifrån resultaten fanns ingen sämre sensitivitet hos b-CAP assay i jämförelse med in-house. Sensitiviteten var högre för *M. pneumoniae* på BD MAX™ då ett prov missades av in-house. Den höga sensitiviteten och specificiteten tyder på att b-CAP assay på BD MAX™ är en tillförlitlig metod som kan ersätta in-house Realtids PCR för *M. pneumoniae* och *C. pneumoniae*. Provantalet som analyserades var endast 23 positiva *M. pneumoniae* och sju positiva *C. pneumoniae* och för att dra bättre slutsatser kring sensitiviteten och specificiteten skulle fler prover analyseras. Spädningsserien av ett positivt patientprov för *C. pneumoniae* ökar tillförlitligheten då ingen skillnad i detektionsnivå sågs mellan BD MAX™ och in-house. Spädningsserien gjordes även eftersom inga fler *C. pneumoniae* positiva prover fanns tillgängliga.

Analysen kan användas som ett komplement till odling för *L. pneumophila* då en jämförelse mellan odling och b-CAP assay inte visade någon skillnad i resultat. Eftersom även *C. psittaci* kan analyseras behöver inte misstänkta prover skickas till annat laboratorium för analys då även b-CAP assay på BD MAX™ används vid det laboratoriet. Det leder till snabbare provsvar och insättning av riktad behandling för patienten. Endast fem positiva *C. psittaci* analyserades vilket inte är tillräckligt för att dra slutsatser kring sensitiviteten och specificiteten. Det fanns bara dessa proverna tillgängliga för analys och därför kunde inte provantalet utökas.

Den 4-plex kontroll som tillverkades innehållandes en optimal koncentration av vardera agens kommer användas som positiv kontroll. Det är inte nödvändigt att analysera kontrollen vid

varje tillfälle som patientprover analyseras eftersom en internkontroll finns tillsatt i alla prover.

Utveckling i framtiden för denna metod vid Universitetssjukhuset Örebro kan involvera flera agens. Andra bakterier som orsakar samhällsförvärd pneumoni kanske kan läggas till för att kunna bredda analysen.

Slutsats

Slutsatsen som kan dras utifrån resultaten är att b-CAP assay på BD MAX™ är en metod med hög sensitivitet och specificitet för *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* och *L. pneumophila*.

Metoden var känslig och jämförbar med in-house realtids PCR och odling. Sensitiviteten var lägre för *C. psittaci* då ett prov missades. Dock analyserades endast ett fåtal prover för detta agens och ej under optimala förhållanden vilket är varför fler prover bör analyseras för *C. psittaci*.

REFERENSER

1. Arvidson S, Blomberg J, Brauner A, Castor B, Falk K, Kärre K, et al. Medicinsk mikrobiologi och immunologi. 1:a upplaga. Lund: Studentlitteratur AB; 2015.
2. Cillóniz C, Torres A, Niederman M, van der Eerden M, Chalmers J, Welte T, et al. Community-acquired pneumonia related to intracellular pathogens. *Intensive Care Med.* 2016;42:1374–86.
3. Silva MT. Classical Labeling of Bacterial Pathogens According to Their Lifestyle in the Host: Inconsistencies and Alternatives. *Front Microbiol.* 2012;3:10.3389/fmicb.2012.00071.
4. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. *Manual of clinical microbiology.* 11th edition. Washington, DC: ASM Press; 2015.
5. Tille P. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology.* 13th edition. St. Louis: Elsevier Mosby; 2014.
6. Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H, Fukushi H. Detection of *Chlamydophila psittaci* by using SYBR green real-time PCR. *J Vet Med Sci.* 2011;73:249–54.
7. Madani SA, Peighambari SM. PCR-based diagnosis, molecular characterization and detection of atypical strains of avian *Chlamydia psittaci* in companion and wild birds. *Avian Pathol J WVPA.* 2013;42:38–44.
8. Buckingham L. *Molecular diagnostics : fundamentals, methods and clinical applications.* 2nd edition. Philadelphia: F.A. Davis; 2012.
9. Kessler HH, editor. *Molecular Diagnostics of Infectious Diseases.* 3rd edition. Berlin: De Gruyter, Inc; 2014.
10. Keller A, Meese E, editors. *Nucleic Acids as Molecular Diagnostics.* 1st edition. Weinheim: John Wiley & Sons, Incorporated; 2014.
11. ReadyMax™ Assays for BD-MAX platforms [Internet]. Nijmegen: Biolegio; - [cited 2018 Apr 28]. Available from: <https://www.biolegio.com/products-services/readymax-assays-for-the-bd-max>
12. Nolte FS, Metchock B, McGowan JE, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1777–82.
13. Rocchetti TT, Silbert S, Gostnell A, Kubasek C, Widen R. Validation of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis* Complex, and *Mycobacterium avium* Complex Directly from Clinical Samples by Use of the BD Max Open System. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1644–7.
14. Mitchell M, Dizon D, Libke R, Peterson M, Slater D, Dhillon A. Development of a Real-Time PCR Assay for Identification of *Coccidioides immitis* by Use of the BD Max System. *J Clin Microbiol.* 2015;53:926–9.

15. Dalpke AH, Hofko M, Zimmermann S. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Pneumocystis jirovecii* on the Fully Automated BD MAX Platform. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2337–43.
16. Mustafa MIA, Al-Marzooq F, How SH, Kuan YC, Ng TH. The use of multiplex real-time PCR improves the detection of the bacterial etiology of community acquired pneumonia. *Trop Biomed*. 2011;28:531–44.
17. Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;21:788.e1-788.e13.
18. Nummi M, Mannonen L, Puolakkainen M. Development of a multiplex real-time PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and mutations associated with macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* from respiratory clinical specimens. *SpringerPlus*. 2015;4:684.
19. Gowin E, Bartkowska-Śniatkowska A, Jończyk-Potoczna K, Wysocka-Leszczynska J, Bobkowski W, Fichna P, et al. Assessment of the Usefulness of Multiplex Real-Time PCR Tests in the Diagnostic and Therapeutic Process of Pneumonia in Hospitalized Children: A Single-Center Experience. *BioMed Res Int*. 2017;2017:10.1155/2017/8037963.