Het ontwikkelen en valideren van een Real-Time PCR voor de detectie van *Pneumocystis jirovecii* pneumonie

K. Zuiver en A. Vahidnia

streek lab
laboratorium voor medische microbiologie

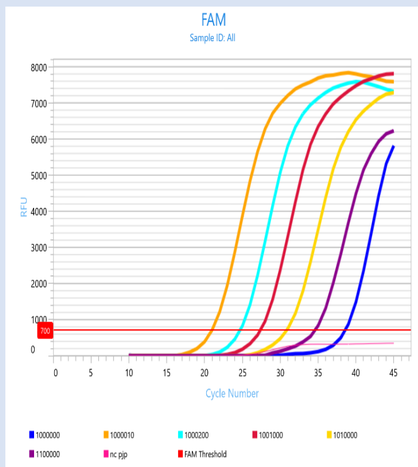
Introductie

De *Pneumocystis jirovecii* is een schimmel die een opportunistische infectie kan veroorzaken bij immuungecompromitteerde patiënten (HIV/kanker)[1]. De schimmel kan een ernstige pneumonie veroorzaken ook wel een *Pneumocystis jirovecii* pneumonie (PJP) genoemd. De huidige diagnostiek van een PJP gebeurt door middel van Real-Time PCR, CT-scan van de thorax en het klinische beeld [2].

Probleemstelling

In hoeverre is het mogelijk de workflow te optimaliseren in tijd, kosten en efficiëntie ten opzichte van de huidige workflow BD-max en de kwaliteit (analytische en diagnostische karakteristieken) te verbeteren door gebruik te maken van een two target strategy op de platformen PantherFusion en Bio-Rad en zijn de resultaten een voldoende verbetering over de BioGX op de BD-max om deze te vervangen?

Technische Resultaten



Figuur 2: Verdunningsreeks van het plasmide voor het target mtLSU.

- **Herhaalbaarheid** <1,5 Ct verschil op de PantherFusion en Bio-Rad
- **Analytische sensitiviteit** (LOD)
  - **PantherFusion**
    R^2>0,98 & Ct>35 (40,1)
  - **Bio-Rad**
    R^2>0,94 & Ct>35 (41,2)
- **Analytische specificiteit** 100%

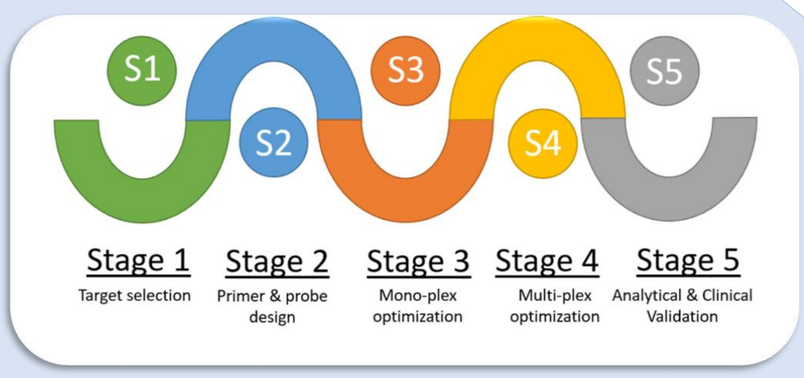
29 off targets (geen kruisreactie)

Conclusie

- De LDT-PJP op de PantherFusion & Bio-Rad is bijna **20%** sensitiever dan de BioGX
- De diagnostische accuraatheid van de LDT-PJP is bijna **10%** hoger dan de BioGX
- De LDT-PJP op de PantherFusion & Bio-Rad **voldoet aan alle validatie-eisen**. De LDT-PJP wordt geïmplementeerd en zal de BioGX op de BD MAX vervangen

Methode

De PantherFusion en Bio-Rad hebben **qPCR** als techniek



Figuur 1: Figuur 1: De stappen van het onderzoek voor het ontwikkelen en valideren van de LDT-PJP;
Stage 1: Target selectie middels literatuuronderzoek (mtLSU en mtSSU)
Stage 2: Ontwikkelen van primers en probes (IDT-software)
Stage 3: Monoplex optimalisatie (m.b.v. plasmide)
Stage 4: Multiplex optimalisatie (m.b.v. plasmide)
Stage 5: Analytische en klinische validatie (n=100 patiëntmaterialen)

Klinische resultaten

Totaal 100 klinische patiëntmaterialen getest (retro- en prospectief verzameld)

Positief (n=38)
Negatief (n=62)

Tabel I: De percentages van de diagnostische karakteristieken van de drie platformen t.o.v. de Gouden Standaard (cumulatief).

	PantherFusion	Bio-Rad	BioGX
Diag Sensitiviteit	94,74	94,74	73,68
Diag Specificiteit	100,00	100,00	100,00
Diag Accuraatheid	98,00	98,00	90,00
PVW	100,00	100,00	100,00
NVW	96,88	96,88	86,11

Discussie

Uitgangspunt van deze studie was om minimaal **2 van de 3** kaders te verbeteren:

1. Verbetering in **kwaliteit** (mtLSU/mtSSU Vs MSG [3]; sensitiviteit)
2. Verbetering in **doorlooptijd** (Random access, geen voorbehandeling vereist)
3. **Prijsreductie** (LDT-PJP is 73% goedkoper t.o.v. BioGX

Referenties

[1] Liu, B., Totten, M., Nematollahi, S., Datta, K., Memon, W., Marimuthu, S., ... & Zhang, S. X. (2020). Development and evaluation of a fully automated molecular assay targeting the mitochondrial small subunit rRNA gene for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage fluid specimens. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *22*(12), 1482-1493
[2] Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative real-time PCR: recent advances. *Clinical Applications of PCR*, 161-176.
[3] Wada, M., Sunkin, S. M., Stringer, J. R., & Nakamura, Y. (1995). Antigenic variation by positional control of major surface glycoprotein gene expression in Pneumocystis carinii. Journal of Infectious Diseases, 171(6), 1563-1568.