



Høgskolen i Telemark

Utvikling og etablering av en kvalitativ Real-time PCR analyse for DNA påvisning av *Mycoplasma genitalium* til diagnostisk bruk innen medisinsk mikrobiologi.

Jan Helge Lislevand



Mycoplasma genitalium

Foto: Kenyon College

Mastergradsoppgave i natur, helse og miljøvern, tilrettelagt for
bioingeniører

2009

60 studiepoeng



Avdeling for allmennvitenskaplige fag

Hallvard Eikas plass, 3800 Bø



Høgskolen i Telemark

Tittel:	Utvikling og etablering av en kvalitativ Real-time PCR analyse for DNA påvisning av <i>Mycoplasma genitalium</i> til diagnostisk bruk innen medisinsk mikrobiologi.
Nøkkelord:	<i>Mycoplasma genitalium</i> , Uretritt, cervisitt, Real-time PCR, IVD-direktivet, CE-merking.
Forfatter:	Jan Helge Lislevand
Studentnr.:	060872
Fagkode:	4317
Oppgavetype:	Mastergradsoppgave
Studiepoeng:	60
Studium:	Natur-, helse- og miljøvern tilrettelagt for bioingeniører
Konfidensiell:	Nei



Avdeling for allmennvitenskaplige fag

Hallvard Eikas plass, 3800 Bø

Forord

Denne mastergradsoppgaven er tilknyttet Institutt for natur-, helse- og miljøvern, Høgskolen i Telemark, avd. Bø. All praktisk arbeid er utført ved Enhet for mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF, Kristiansand.

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere, overlege og driftsleder ved Enhet for mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF, Sølvi Noraas, og professor i miljørettet helsevern ved Høgskolen i Telemark, Olav Rosef, for å ha bidratt med faglige innspill og engasjement. Vil også takke min arbeidsgiver ved Sølvi Noraas og klinikkssjef Gun-Elise Gustafsson for å ha lagt til rette for at jeg har kunnet kombinere mastergradsstudiet i Bø med stillingen som bioingeniør ved Enhet for mikrobiologi. Vil ellers benytte anledningen til å takke Hanne Quarsten på PCR laboratoriet, og resten av mine gode kolleger ved enheten, for tålmodighet, støtte og for håndteringen av arbeidsbelastningen jeg har påført dere med mitt fravær.

Takker biblioteket ved Sørlandet sykehus HF, Kristiansand for all litteratur dere har fremskaffet.

Vil også takke Amir Moghaddam ved Fürst Medisinsk Laboratorium for å ha bidratt med positive pasientprøver, og Olfert Landt ved Tib Molbiol for design av primere og prober.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke min kjære kone, Gunhild, og mine tre barn for og vist grenseløs tålmodighet og støtte gjennom tre år. Jeg er så glad i dere.

Kristiansand, april 2009

Jan Helge Lislevand

Innhold:

Forord	1
Innhold:	2
Sammendrag	4
English summary	5
1 Innledning	6
1.1 Taksonomi, basal biologi og genominformasjon	6
1.2 Adhesjon og patogenese	8
1.3 Smitteveier, forekomst og utbredelse	9
1.4 Symptomer og forløp	10
1.5 Diagnostikk	10
1.5.1 Dyrking	10
1.5.2 Serologi	11
1.5.3 Nukleinsyrepåvisning med Polymerase Chain Reaction (PCR)	11
1.6 Behandling	11
1.7 Formålet med oppgaven	12
2 Teori	13
2.1 IVD direktivet	13
2.2 Real-time PCR	18
2.3 Verifisering, validering og kontaminasjonskontroll	21
2.3.1 Verifisering	21
2.3.2 Nøyaktighet	22
2.3.3 Presisjon	22
2.3.4 Analytisk sensitivitet	22
2.3.5 Analytisk spesifisitet	22
2.3.6 Validering	23
2.3.7 Effektivitet	23
2.3.8 Kontroller	24
2.3.9 Intern hemmerkontroll (IC)	24
2.4 Målgen	24
3 Materiale og metode	26
3.1 Prøvemateriale	26

3.1.1	Retningslinjer for prøvetaking	26
3.1.2	Forbehandling og ekstraksjon	26
3.2	Kontrollmateriale	27
3.3	Primer og probe design	27
3.3.1	Primer-dimer test.....	30
3.3.2	Valg av revers-primer.....	30
3.4	Optimalisering.....	30
3.5	Verifisering.....	31
3.5.1	Stabilitet	31
3.5.2	Analytisk sensitivitet.....	31
3.5.3	Analytisk spesifisitet	31
3.5.4	Nøyaktighet.....	32
3.5.5	Presisjon	32
3.6	Validering.....	33
3.6.1	Robusthet ved volumendringer	33
3.6.2	Effektivitet.....	33
3.7	Statistikk.....	33
4	Resultater.....	34
4.1	Primervalg	34
4.2	Optimalisering.....	35
4.3	Validering.....	36
4.3.1	Stabilitet	36
4.3.2	Analytisk sensitivitet.....	37
4.3.3	Analytisk spesifisitet:	38
4.3.4	Nøyaktighet	40
4.3.5	Presisjon	42
4.4	Validering.....	43
4.4.1	Robusthet ved volumendringer	43
4.4.2	Effektivitet.....	44
5	Diskusjon.....	49
5.1	Analytisk sensitivitet.....	49
5.2	Analytisk spesifisitet.....	50
5.3	Nøyaktighet.....	51

5.4	Presisjon	51
5.5	Måleområde.....	52
5.6	Valg av intern hemmerkontroll	52
5.7	IVD-godkjenning	53
5.8	Hva skal CE-merkes?	54
5.9	Risikovurdering:.....	55
5.10	Validering:.....	55
5.11	Robusthet ved volumendringer	56
5.12	Effektivitet.....	57
5.13	Kontaminasjon:	57
5.14	Dokumentasjon.....	58
6	Konklusjon	58
7	Litteratur.....	59
	Bruerveiledning og samsvarsvurdering.....	67
	Valideringsrapport.....	73
	Samsvarserklæring	75

Sammendrag

Mycoplasma genitalium er assosiert med infeksjoner i urogenitaltraktus hos kvinner og menn. Bakterien overføres ved seksuell kontakt og gir mange av de samme symptomene som *Chlamydia trachomatis*. De vanligste symptomene er utflod fra urinrørsåpningen og sviende smerter ved vannlating. Hos kvinner kan det dessuten være utflod fra skjeden som ved cervisitt. Mange av de *M. genitalium* infiserte vil imidlertid ikke ha symptomer, og er dermed asymptomatiske.

M. genitalium er vanskelig å dyrke, og kryssreaksjoner med *M. pneumoniae* kompliserer serologiske metoder. I fravær av kommersielle molekylærgenetiske metoder er det i denne studien utviklet og etablert en Real-time PCR (*Polymerase Chain Reaction*) analyse som kan benyttes til rutinediagnostikk av *M. genitalium* innen medisinsk mikrobiologi. Analysen er optimalisert, verifisert og validert etter de kravene som er oppgitt i loven om medisinsk utstyr til *in vitro*-diagnostikk (IVD direktivet), og er godkjent for prøvematerialene urin og endocervikalt sekret. Den egenutviklede analysen er kvalitativ og designet for påvisning av husholdningsgenet, *glyceraldehyde-3-phosphate (gap)*, fra *M. genitalium* og en intern hemmerkontroll (*MS2 DNA*).

Resultatene viste at Real-time PCR analysen har en deteksjonsgrense, LOD_{95} (*Limit of Detection*), på 35 bakteriegenom/PCR reaksjon for både biologisk og ikke biologisk materiale. Ingen krysshybridisering av mikrober, nært beslektet med *M. genitalium* eller tilhørende floraen i urogenitaltraktus, ble påvist med Real-time PCR analysen. Et BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) søk i GenBank viste eksakte treff av primerne og proben til kun sekvensene på *gap* genet til *M. genitalium* (aksesjonsnummer L43967).

Amplifikasjonen viste en effektivitet på 107, 108 og 100 % for henholdsvis urin, cervikalt sekret og ikke biologisk materiale. Intra-assay variasjonen samlet, for alle materialene, varierte fra CV 0,5 % til CV 3,5 % ved høy konsentrasjon av templatet, og CV 0,4 % til CV 2,4 % ved lav konsentrasjon. Inter-assay variasjonen varierte fra CV 0,8 % til CV 3,7 % ved høy konsentrasjon, og CV 1,5 % til CV 2,4 % ved lav konsentrasjon. Undersøkelse av 50 positive og 50 negative pasientprøver viste at den egenutviklede analysen har en diagnostisk sensitivitet, spesifisitet, positiv og negativ prediktiv verdi på 100 %.

Sammensetningen av PCR-miksen betraktes for å være egenprodusert og må dermed IVD godkjennes. Det er lite hensiktsmessig å påføre CE-merket på PCR-miksen, da den må lages like før bruk. CE-merket er påført en egenprodusert primermiksløsning som er en av ingrediensene i PCR-miksen.

English summary

Mycoplasma genitalium is associated with infections in urogenital tract. The bacterium is sexual transmitted, and causing many of the same symptoms as *Chlamydia trachomatis*. The most common symptoms are urethral secretions and burning pain at micturation. In women it can cause secretions from vagina. Many of the *M. genitalium* infected will have no symptoms, and these individuals can unknowingly spread the bacterium to others.

M. genitalium is difficult to cultivate, and cross-reactions with *M. pneumoniae* complicating serological methods. In the absence of commercial molecular genetic methods, there is in this study developed and established a Real-time PCR (polymerase chain reaction) analysis that can be used for routine diagnosis of *M. genitalium* in medical microbiology laboratory. The analysis is optimized, verified and validated by the requirements specified in the law of medical equipment for *in vitro* diagnostics (IVD-Directive), and approved for urine samples and endocervical secretions. The self-developed analysis is qualitative and designed for the detection of the housekeeping gene, *glyceraldehyde-3-phosphate (gap)*, from *M. genitalium* and an internal inhibition control (*MS2* DNA).

The results showed that the Real-time PCR assay has a detection limit, LOD₉₅ (Limit of Detection), of 35 genome/PCR reaction for both biological and non biological materials. No cross-hybridization with microbes, closely related to *M. genitalium* or associated flora in urogenital tract, was discovered with the Real-time PCR analysis. A BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) search in the GenBank showed exact match of primers and probe to the *gap* gene sequences of *M. genitalium* (accession number L43967). Amplification showed an efficiency of 107, 108 and 100 % for respectively urine, cervical secretions and non biological material. Intra-assay variation for all materials in total ranged from CV 0.5 % to CV 3.5 % at a high concentration of template, and CV 0.4 % to CV 2.4 % at low concentration. Inter-assay variation ranged from CV 0.8 % at CV 3.7 % at high concentration, and CV 1.5 % to CV 2.4 % at low concentration. Survey of 50 positive and 50 negative patient samples showed that the self-developed assay has a diagnostic sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of 100 %.

The composition of PCR-mix is considered to be self-produced and must therefore be IVD approved. The PCR-mix is not suited for the CE-label while it must be prepared just before use. The CE-label is affixed to a self-produced primer mix-solution which is one of the ingredients in the PCR-mix.

1 Innledning

Bakteriene, *Chlamydia trachomatis* og *Neisseria gonorrhoeae*, regnes for å være årsak til de fleste seksuelt overførbare sykdommer hos unge voksne verden over [1]. I mange av tilfellene med symptomatisk non-klamydia, non-gonoréisk uretritt (NCNGU), er etiologisk agens ikke kjent. David Taylor-Robinson samlet 13 prøver fra urethra hos menn med uretritt symptomer. Han var i utgangspunktet på jakt etter å dyrke spiroplasma, da han i 1980 brakte dem til Joe Tully og hans forskergruppe i Maryland (USA). Ved å forlenge dyrkningstiden til mer enn 50 dager, fant forskerne bakterien *Mycoplasma genitalium* i 2 av de 13 prøvene fra pasienter med uretritt symptomer [2]. Dens rolle som patogen var i mange år uklar, men det er nå slått fast at infeksjon med *M. genitalium* er assosiert med uretritt hos kvinner og menn, og cervisitt hos kvinner. Den smitter direkte ved seksuell kontakt [3].

Påvisning av *C. trachomatis* med *Polymerase Chain Reaction* (PCR) har pågått siden tidlig på 1990 tallet. Analysen var den første kommersielle PCR testen på markedet for påvisning av en mikrobe. I Norge ble det i 2007 funnet 22 847 positive prøver av 272 053 utførte undersøkelser, og tallene er stigende [4]. Forekomsten av *N. gonorrhoeae* er betydelig redusert i Norge de siste årene med kun 236 tilfeller i 2007, mot over 16 000 i 1975 [4]. Det finnes ingen kommersielle nukleinsyrebaserte tester for *M. genitalium* på markedet til diagnostisk bruk [5]. Publikasjoner for påvisning av ulike gener hos bakterien med Real-time PCR, såkalt *in house* (egenutviklet) metodikk, finnes [6-10]. Disse blir regnet som forskningstester (*research*) og kan derfor ikke benyttes til rutinediagnostikk ifølge loven om medisinsk utstyr til *in vitro*-diagnostikk (IVD direktivet) [11].

1.1 Taksonomi, basal biologi og genominformasjon

Klassifiseringen er i følge *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* følgende:

Klasse: *Mollicutes*
Orden: *Mycoplasmatales*
Familie: *Mycoplasmataceae*
Slekt: *Mycoplasma*
Art: *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium er en bevegelig grampositiv bakterie med cytoplasmisk membran, men den mangler peptidoglycan cellevegg. *Mycoplasma* omfatter mer enn 100 arter, der 13 regnes for å være en del av den humane flora [12]. *M. genitalium* tilhører de humane mykoplasma-artene og regnes for å være den minste selvreplikerende bakterien som er kjent, med et genom på bare 580 076 nukleotider [13]. Genomets størrelse er kun 10 % av genomet til den største prokaryote organismen, men har samme kodetetthet som andre prokaryoter, omtrent 1 gen per kilobase [14]. Genomet inneholder bare 521 gener, hvorav 482 er proteinkodene [13]. Til sammenligning har *Haemophilus influenzae* 1703 og *Escherichia coli* 4288 proteinkodene gener [15].

M. genitalium mangler gener for biosyntese av enkelte aminosyrer, og har få gener for biosyntese av enkelte nukleinsyrer, vitaminer og fettsyrer. Fettsyrer, tilført fra vertceller, benyttes for syntetiseringen av fosfolipider og glykolipider som inngår i cellemembranen til bakterien. Konsekvensen av det minimale settet med gener er nedsatt proteinsyntese, og replikasjon. Bakterien vokser derfor langsomt med en generasjonstid på 24 timer [13]. Mykoplasmer antas å ha utviklet seg fra grampositive bakterier, sannsynligvis beslektet med klostridier og laktobasiller som gjennom evolusjonen har gitt en genomisk reduksjon [16]. Spesielt de artene av mykoplasma med minst genom har høy mutasjonsfrekvens. Denne egenskapen tillater hurtig utvikling/evolusjon [17].

Genomet til *M. genitalium* ble sekvensert og publisert i 1985 [13]. Det var dermed det andre genomet av en frittlevende organisme som ble sekvensert, etter *H. influenzae*. Det har vist seg at genomet har mange homologe elementer fra det 816 kilobase store genomet til den nært beslektede *Mycoplasma pneumoniae*, som er en kjent luftveispatogen med atypisk pneumoni som klinisk manifestasjon [18].

M. genitalium genomet har en guanin-cytosin (G+C) sammensetning på 32 %, noe som er forholdsvis høyt sammenlignet med andre genomer i slekten som varierer fra 24-32 % G+C [19]. Mykoplasmer er vanskelig å studere med klassiske genetiske metoder, både på grunn av deres vekstkrevende egenskaper og fravær av gode genetiske markører. En felles egenskap for mitokondrier og *Mycoplasma* er at begge bruker UGA (uracil, guanin og adenin) codon for aminosyren tryptofan, til forskjell fra andre bakterier som har UGA codon som stoppsignal i proteinsyntesen. Ekspresjonsanalyse av gener fra *Mycoplasma* kan derfor være problematisk å tolke på grunn av lengden til proteinene ofte bli unormale i forhold til andre bakteriers proteiner [12].

På grunn av bakteriens lille genom, brukes den i forskningsmiljøer som et utgangspunkt til det grunnleggende spørsmålet om hvilke essensielle gener er nødvendig for liv [20]. I februar 2008 kunngjorde en gruppe vitenskapsmenn, med J. Craig Venter i spissen, at de hadde lagd det første syntetiske genomet, *Mycoplasma genitalium* JCVI-1.0, strippet for andre egenskaper enn dem som trengs for vekst og deling. Forskningsgruppen konkluderte med at 387 gener var nødvendig for et liv i laboratorium. For å skille det syntetiske genomet fra vill-type *M. genitalium*, ble det satt inn ekstra sekvenser, ”vanmerker”, i noen områder som er tolerante for transposoner. Prosessen med å sette genomet (582 970 kilobaser) inn i en mykoplasma celle, og få den til å leve som vill-type bakteriene, pågår. Prosjektet har som mål å konstruere bakterier der ekstra gener kan settes inn, slik at de kan virke som en biokjemisk maskin som kan produsere f. eks. hydrogen, biodrivstoff, veksthormoner, absorbere CO₂ eller andre drivhusgasser [21].

1.2 Adhesjon og patogenese

Mycoplasma er flaskeformet og bruker sin terminale ende til å feste seg på overflaten til forskjellige celler. Slekten kan kalles en optimal parasitt fordi de sjelden dreper deres vertcelle, men livnærer seg av essensielle forbindelser fra celleveggen til vertcellen [22]. Akutt infeksjon er sjelden, infeksjonen følger heller et kronisk mønster. Oppdagelsen av adhesjon til vertceller har bidratt til økt kunnskap om forståelsen av patogenesen til mykoplasmer. Manglende cellevegg og fimbrier, som ofte er involvert i adhesjon hos andre bakterier, indikerer at disse prosessene skjer med forbindelser bundet til membranen kalt adhesiner. Tilstedeværelse av flere forskjellige adhesiner hos *M. genitalium* og deres interaksjon med vertceller, er godt dokumentert. *M. genitalium* binder seg til ulike arters erytrocytter med deres adhesinmolekyler fra sin terminale ende [23]. Det er også bevist at de binder seg til eukaryote celler som *Vero Cells* [24] og epitelceller i humane eggledere [25]. Mye forskning gjenstår på interaksjoner mellom vertscellers reseptorer og de ulike adhesiner [12].

4,7 % av genomet til *M. genitalium* består av ni repeterende elementer kalt *MgPa* eller *MgPar* sekvenser [26]. Elementene inneholder tre gener der *mgpB* koder for hoveddelen av adhesin proteinene i genomet [12]. Genet er hypervariabelt mellom *M. genitalium* arter og innen de repeterende sekvensene (sekvenslikhet på 78-90 %) [12]. En hypotese bygger på at denne heterogeniteten gjør at bakteriene kan rekombinere *mgpB* og *MgPa* sekvenser slik at ulike adhesin proteiner dannes. Bakteriene kan på denne måten tilpasse seg den antigene

variasjonen de ulike celletypene har på overflaten når de skal feste seg [27]. *MgpB* genet er en homolog til *PI* genet som koder for et adhesin protein hos *M. pneumoniae*. *PI* er også repeterende, men meget konserverert og godt egnet som målgen for Real-time PCR [1, 28]. *M. genitalium* opptrer som en fakultatitiv intracellulær patogen mikrobe. Den er i stand til å overleve både ekstracellulært og intracellulært *in vitro*. Om det samme skjer *in vivo*, er ikke fortsatt ikke kjent [12]. Etter at bakterien er kommet inn i vertcellen, starter en oppregulering av cytokin genene som er assosiert med betennelsestilstander [29].

1.3 Smitteveier, forekomst og utbredelse

Vevet i urogenitaltraktus ser ut til å være det primære tilholdsstedet for *M. genitalium* [12]. Bakterien kan, i likhet med *C. trachomatis*, påvises i luftveiene, leddvæske og øyne. *M. genitalium* smitter kun mellom mennesker. Ingen dyrereservoar er kjent [12]. Bakterien kan smitte ved ubeskyttet samleie, men det er uvisst om den kan overføres ved oral sex og analt samleie [30]. Mange som er smittet med bakterien, har ingen symptomer, og er således friske smittebærere. Inkubasjonstiden antas å være 1-2 uker, men dette er ennå ikke helt avklart. Uretritt er den hyppigste diagnose hos menn som undersøkes for seksuelt overførbare sykdommer. Omtrent en tredjedel av tilfellene skyldes *C. trachomatis* [5]. Flere studier har konkludert med at *M. genitalium* er en viktig patogen hos mannlige pasienter med NCNGU [19, 31-33]. Infeksjonen forekommer over hele verden med varierende prevalens [12]. I Norge er det utført en større studie av Olafiaklinikken (Oslo), der prøver fra 10 109 pasienter ble testet med Real-time PCR. Pasientene som ble testet hadde enten symptomer på seksuelt overførbart sykdom, seksuell partner med uretritt, cervicitt eller partner med påvist *M. genitalium* eller *C. trachomatis*. *M. genitalium* ble påvist hos 452 (4,5 %) av pasientene. Hos 48 (10,6 %) ble det påvist en koinfeksjon med *C. trachomatis*. Det er en signifikant høyere andel pasienter med uretritt symptomer som er positive for *M. genitalium* enn hos asymptotiske pasienter [34, 35]. I en studie fra Japan ble det funnet meget lave DNA konsentrasjoner (< 200 bakterier/ml) av *M. genitalium* hos samtlige asymptotiske menn. Hos menn med symptomer, hadde alle en konsentrasjon fra 230 bakterier/ml til $3,3 \times 10^6$ bakterier/ml [19]. Selv om populasjonen i dette forsøket var liten, kan dette være nyttig informasjon når en diagnose skal stilles.

1.4 Symptomer og forløp

Bakterien kan gi uretritt med symptomer som svie og utflod ved vannlating [36]. Utfra symptomene, er det er ikke mulig å skille infeksjonen fra *C. trachomatis*. Definisjonen på uretritt er mer enn fire leukocytter per synsfelt i minst fem felt ved mikroskopi i 1000 x forstørrelse av farget utstryk (metylenblått) fra distale uretra [5]. Hos kvinner kan det være utflod fra skjeden, hvis det er betennelse i livmorhalsen. Friske slimhinner utgjør en barriere for smitteoverføring av for eksempel HIV. En infeksjon i slimhinnene i form av uretritt, cervicitt eller lignende, kan føre til en svekkelse av barrieren. Dette kan resultere i økt mottakelighet for infeksjon med HIV [5]. Det er fortsatt usikkert om bakterien kan forårsake infeksjon i øvre genitaltraktus med senfølger som infertilitet og kroniske bekkensmerter. I enkelte tilfeller kan den påvises hos kvinner med komplisert underlivsbetennelse, *Pelvic Inflammatory Disease* (PID), mens infeksjonen hos menn antas å kunne utvikle seg til en betennelse i bitestiklene (epididymitt) eller prostatitt [37, 38]. Det pågår for tiden internasjonale studier for å undersøke mulige senfølger hos kvinner [3]. Etter flere års forskning har Statens Serum Institutt i Danmark, bidratt til å forbedre diagnostikken og anbefalinger av antibiotikabehandling [39]. Instituttet har i flere år tilbudt PCR diagnostikk til pasienter med symptomer. Folkehelseinstituttet har nylig oppdatert sin informasjon om sykdommens rolle i smittevernhandboka [3].

På grunn av likheten med *C. trachomatis* spekuleres det om *M. genitalium* også kan gi seksuelt trigget reaktiv artritt (SARA) [40, 41].

Til tross for flere studier, finnes det foreløpig ingen beviser for at *M. genitalium* kan regnes for å være en luftveispatogen [42, 43].

1.5 Diagnostikk

1.5.1 Dyrking

Dyrking av *M. genitalium* i cellekulturer er en svært tidkrevende prosess med lav sensitivitet. Opptil 6 måneders dyrking er ikke uvanlig før stammen kan påvises [44]. Optimalisering av transportmedium (for eksempel *Sugar Phosphat-4* og *Sugar Phosphat-2*) og cellelinjer med antibiotika/antimykotika kan være med på å bedre sensitiviteten. Det er beskrevet at mikroben kan påvises etter 14 – 20 dagers inkubering i en cellekultur med optimalt miljø [45].

1.5.2 Serologi

Kryssreaksjoner mellom *M. pneumoniae* og *M. genitalium* har gjort det problematisk å etablere en spesifikk serologisk antistofftest. Kryssreaksjoner er funnet både med antisera fra kaniner immunisert med *M. pneumoniae* og *M. genitalium*, og med humane sera fra pasienter med *M. pneumoniae* infeksjon [46]. Artritter kan være en mulig indikasjon for serologi. Serologi må tolkes sammen med klinikk, og eventuelt bekreftes med nukleinsyre påvisning. Det er ingen kjent kommersiell test på markedet i dag [5].

1.5.3 Nukleinsyre påvisning med Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR baserte metoder blir i økende grad brukt til diagnostikk innen medisinsk mikrobiologi fordi de er hurtige, spesifikke og sensitive. Svært lave konsentrasjoner av DNA kan påvises og svar vil kunne foreligge i løpet av to-tre timer. Den første PCR baserte testen for *M. genitalium* ble publisert i 1991 og brukte *MgPa* som målgen, fordi det ble ansett for å være meget konservert, og ha en viktig rolle i patogenesen til infeksjonen [47].

1.6 Behandling

Ulike typer antibiotika er brukt til behandling av *M. genitalium* infeksjoner, men den optimale behandling er ennå ikke fastlagt. På grunn av bakteriens vanskelige og tidkrevende dyrkingsmønster, er det ikke mulig å utføre resistensbestemmelse i rutinediagnostikk [5]. Resistensoppvarsjoner baserer seg først og fremst på terapivikt. Den mest kjente antibiotikaklassen, betalaktamer som blant annet inkluderer alle penicilliner, er ikke virksomme fordi bakterien mangler cellevegg. Penicillinets virkemåte er svekkelse av celleveggen slik at bakterien oppløses. Penicillinene er baktericide, de interfererer med celleveggsyntesen slik at celleveggen ødelegges og bakterien dør. Tetracycliner og makrolider er bakteriostatiske antibiotika som binder seg til ribosomene og hemmer proteinsyntesen og derved bremser veksten. Disse er førstevalgspreparater til behandling av infeksjoner med *C. trachomatis* som også mangler cellevegg. Tetracyclin eller erytromycin (makrolid) behandling i 7–10 dager har vist seg å være lite effektiv, både i forsøk med pasienter, og i *in vitro* studier med cellkulturer [48-50]. Årsaken er ikke kjent, men en teori er at *M. genitalium* kan være beskyttet mot antibiotika ved at den kan oppholde seg intracellulært, i en hviletilstand, over lengre tid [12]. Azitromycin har en litt annen struktur enn de andre makrolidene, og gir en høyere intracellulær konsentrasjon [51]. Flere studier har vist at

behandling med azitromycin gir bedre effekt enn behandling med tetracycliner [48, 50, 52, 53]. Olafiaklinikken i Oslo har sammenlignet tre forskjellige behandlingsopplegg for pasienter med påvist *M. genitalium*. 452 pasienter inngikk i studien. Det ble gitt p. o. azitromycin, ofloxacin eller moxifloxacin [54]. Ofloxacin og moxifloxacin er henholdsvis andre og fjerdegenerasjons fluorkinoloner som hemmer DNA gyrase [55]. Resultatet viste en behandlingseffekt i 79 % av tilfellene med engangsdose av 1 gram azitromycin. Den noe lave behandlingseffekten kan forklares med at engangsdose med azitromycin kan indusere resistens hos *M. genitalium*. Behandlingseffekten med fluorkinoloner var meget god, særlig for moxifloxacin. Siden færre av pasientene ble behandlet med fluorkinoloner er ikke tallene sammenlignbare. Fluorkinoloner er kjent for å kunne gi en del skadevirkninger og resistensutvikling [56], og moxifloxacin kan kun foreskrives på registreringsfritak i Norge [5]. Olafiaklinikken anbefaler, i likhet med Folkehelseinstituttet, engangsdose med 1 gram azitromycin som førstehåndspreparat. Ved persisterende infeksjoner etter behandlingssvikt med azitromycin, kan moxifloxacin være et godt alternativ [54].

1.7 Formålet med oppgaven

Formålet med denne oppgaven var å utvikle og etablere en kvalitativ Real-time PCR metode for DNA påvisning av *Mycoplasma genitalium*. Testen måtte oppfylle IVD-direktivets betingelser for medisinsk utstyr og være CE merket for å kunne anvendes innenfor all diagnostikk i medisinsk mikrobiologi. Det ble valgt et konservert og spesifikt gen med egnende primer og probesekvenser. Real-time PCR analysen er optimalisert, verifisert og validert etter *Food and Drug Administration* (FDA) sine krav for egenutviklede laborietester [57]. Analysen er konstruert som en dupleks PCR, der en intern hemmerkontroll er implementert for å avsløre om hvert prøvemateriale inneholder PCR inhiberende komponenter. Testen ble validert for prøvematerialene urin og cervikalt sekret, høstet med pensel. Ekstraksjon av prøvematerialene er utført med MagnaPure LC.

2 Teori

2.1 IVD direktivet

Europaparlaments- og rådsdirektiv 98/79/EF om medisinsk utstyr til *in vitro*-diagnostikk (IVD-direktivet) trådte i kraft i EU/EØS-området 7. desember 1998 [11]. Direktivet komplementerer tidligere EU-regulering for annet medisinsk utstyr og er et såkalt ny metode-direktiv. Direktivet pålegger produsenten av IVD å sørge for at produktene oppfyller gitte grunnleggende krav til produkters sikkerhet, kvalitet og yteevne. Hensikten er å harmonisere lovgivningen i EUs medlemsstater, for derved å hindre handelshindringer som kan oppstå dersom ulike land stiller ulike nasjonale krav til produkters egenskaper. IVD-direktivet ble implementert i norsk lovgivning 26. oktober 2001. Etter flere overgangsperioder ble den endelige fristen satt til 1. april 2006. Etter denne datoen må produkter, som omfattes av IVD-direktivet, være i samsvar med direktivets krav for å kunne markedsføres, og være påsatt CE-merke (Figur 1) før det kan tas i bruk. CE-merket er et handelsteknisk merke som påføres utstyret/reagenser for å vise at det er i samsvar med alle gjeldende krav [58].



Figur 1. CE = Communautés Européennes, CE-merke som skal påføres produkter som omfattes av IVD-direktivet.

Medisinsk utstyr for IVD er beregnet til undersøkelse av prøver fra menneskekroppen til medisinske formål. For egenutviklede (*in-house*) tester som omfattes av IVD-direktivet, blir sykehuset/helseforetaket å betrakte som produsent og har derfor juridiske rettigheter og plikter knyttet til seg. Hvis sykehuset/helseforetaket mottar penger, for eksempel en refusjonstakst for et rapportert prøveresultat, er dette å betrakte som en kommersiell transaksjon.

CE merking er ikke påkrevet for:

Utstyr/reagenser som kun benyttes innenfor én og samme helseinstitusjon, på produktstedet, og kun på de pasientene som helseinstitusjonen har juridisk ansvar for, det vil si inneliggende og polikliniske pasienter.

CE merking er påkrevet for:

Utstyr/reagenser som benyttes til å analysere prøver fra andre helseinstitusjoner eller juridiske enheter, inkludert primærhelsetjenesten.

Utstyr/reagenser som benyttes til å produsere resultater som er gjenstand for en økonomisk transaksjon, for eksempel prøver som sykehuset mottar refusjon for.

Helseinstitusjoner i direktivets sammenheng skal forstås vidt, og omfatter foretak, organer, institusjoner etc. som yter helsetjenester til pasienter, inklusive poliklinikker.

Produsentens forpliktelser:

- Kvalitetssystem for produksjonen.
- Sørge for at all teknisk dokumentasjon er tilgjengelig for myndighetene på forespørsel.
- Brukerveiledning skal medfølge produktet.
- Gjøre en samsvarsvurdering opp mot kravene i direktivet, og utstede en samsvarserklæring.
- Registrering i Utstyrsregisteret hos Helsedirektoratet.
- CE-merket skal påføres utstyret og bruksanvisningen.
- System for kontinuerlig produktovervåking og kvalitetskontroll.
- Meldeplikt ved feilfunksjon.

CE-merket gjelder så lenge følgende forutsetninger er oppfylt:

- Alle komponentene i analysesystemet, det vil si prøveprepareringsutstyr, testreagenser, standarder, instrument og software brukes i den validerte kombinasjonen.
- Brukes i samsvar med produsentens validerte arbeidsflyt, som er angitt i brukerveiledningen.
- Brukes innenfor ”tiltenkt bruk” som angitt i brukerveiledningen.

Brukerveiledning og samsvarsvurdering skal foreligge sammen med produktet og må inneholde:

- Angivelse av produktets tiltenkte bruk.
- Detaljert beskrivelse om bruk av produktet.
- Prinsippet for målemetoden (deteksjonsprinsippet).
- Sammensetning av reagenser.
- Lagringsbetingelser og holdbarhet.
- Retningslinjer for kalibrering og brukervedlikehold.
- Tiltak dersom produktets ytelse endres.

Samsvarsvurdering:

- Beskrivelse av produktet.
- Dokumentasjon av kvalitetssystemet.
- Opplysninger om konstruksjon, virkemåte og produksjon.
- Opplysninger om opprinnelse hvis det er innhold av humane komponenter.
- Risikoanalyser og henvisning til harmoniserte standarder.
- Utprøvningsrapporter.
- Merking og bruksanvisning.
- Resultater og stabilitetsundersøkelser.

For enkelte produkter er det særskilte krav:

Liste A inneholder produkter som representerer en høy risiko for pasienter i tilfelle svikt. HIV, Hepatitt B, C, D og HTLV 1 og 2 er de infeksjose agens på listen. Liste B inneholder produkter som representerer en risiko for pasienter i tilfelle svikt. *Chlamydia*, cytomegalovirus, rubella og toxoplasmosis er de infeksjose agens på listen (nomenklaturen er hentet fra Liste B og er litt uklar å forholde seg til ved at det nevnes slektsnavn og ikke artsnavn). Dersom produktet faller inn under området som er listet opp i A eller B, innebærer det en noe mer omfattende samvurdering med en kontroll av et uavhengig tredjepartsorgan, et såkalt teknisk kontrollorgan. For agens som ikke er oppført på listene gjelder grunnleggende krav, og produsenten må selv finne hvor akseptabelt nivå ligger. Det er imidlertid utarbeidet en rekke standarder som angir mer detaljert hva kravene innebærer. Det er opp til produsenten selv å avgjøre om standardene vil følges, eller på annen måte dokumentere at kravene i direktivene er oppfylt. Dersom standarder ikke følges, må produsenten dokumentere at de grunnleggende krav er oppfylt på annen måte.

Grunnleggende krav:

- Høyt sikkerhetsnivå for produksjonen.
- Fjerne, begrense eller informere om faren ved produksjon.
- Beskrivelse av analyseprinsipp.
- Sporbarhet av verdier for kontroller.
- Krav til holdbarhet/stabilitet.
- Analytiske spesifikasjoner.
- Analytisk og diagnostisk sensitivitet.
- Analytisk og diagnostisk spesifisitet.
- Nøyaktighet, reproduserbarhet.
- Deteksjonsgrense.
- Måleområde.
- Kjente interferenser og begrensinger.

Produsenten skal alltid utstede en samsvarserklæring om at deres produkter oppfyller direktivets krav, før CE-merket kan påføres.

Samsvarserklæringen må inneholde:

- Produsentens navn og adresse.
- Navn på produkt.
- Erklæring om at nevnte produkt er i overensstemmelse med de relevante grunnleggende krav gitt i IVD-direktivet.
- Navn og funksjon av den ansvarlige hos produsenten.
- Dato og signatur.

Erklæringen, sammen med teknisk dokumentasjon, skal oppbevares av produsenten i 5 år, og skal på anmodning gjøres tilgjengelig for fagmyndighet og/ eller teknisk kontrollorgan. Dette innebærer at produktet fritt kan markedsføres og tas i bruk i hele EU/EØS-området.

Utstysregisteret:

Enhver med forretningsadresse i Norge og som er produsent eller leverandør av IVD-utstyr skal registrere seg og sine produkter i Utstysregisteret hos Helsedirektoratet.

Registreringssiden finnes på hjemmesiden til Helsedirektoratet [59]. Det er utviklet et nytt globalt nomenklatur for medisinsk utstyr som er et viktig element i CE-merking i EU-direktivene. *Global Medical Device Nomenclature* (GMDN) er den eneste nomenklatur som brukes til offisiell klassifisering innen EU/EØS. GMDN er implementert i Utstysregisteret, og den registreringspliktige skal benytte denne nomenklaturen når produktene registreres.

Melding ved feil, skader uhell og svikt:

Feil ved utstyr, samt skader, uhell og svikt der medisinsk utstyr er eller kan ha vært involvert, skal meldes til myndighetene. Feilene må være av en så alvorlig art at det kan føre til, eller kunne ha ført til, pasientens, brukerens, annen persons død eller alvorlig forverring av pasientens, brukerens eller annen persons helsetilstand. Den som produserer, omsetter, eier eller i sin virksomhet bruker utstyret, plikter å gi slik melding [60].

2.2 Real-time PCR

PCR er en teknikk som ble utviklet tidlig på 1980 tallet [61]. Den har senere hatt stor betydning for forskning og bioteknologi. Kartleggingen av det humane genom og andre organismer, hadde ikke vært mulig uten PCR. Teknikken har revolusjonert diagnostikken innenfor blant annen rettsmedisin, kreftmedisin, farmasøytisk industri og fylogeni. Målet med PCR er å kopiere en bit av en gensekvens i tilstrekkelig mange kopier, slik at deteksjon er mulig. Teknikken er svært sensitiv, og har den fordelen at den ikke er avhengig av et fenotypisk uttrykk som ofte kan variere innen samme individ og art.

Kort forklart er prinsippet for en tre-trinns konvensjonell PCR:

- Trinn 1. Oppvarming til 93-98 °C (denaturering). Dobbeltrådet DNA splittes til to enkelttråder.
- Trinn 2. Avkjøling til vanligvis 45–65 °C (hybridisering). To egendesignede enkelttrådet oligonukleotider, primere (ca. 20 basepar), hybridiserer til hver sin DNA tråd (templat) i hver ende av målgenet. Oligonukleotidene er komplementære til sekvensen de hybridiserer til.
- Trinn 3. Oppvarming til 72 °C (polymerisering) som er DNA polymerases optimale temperatur. DNA polymerase forlenger primerens 3' ende ved å koble sammen de fire basenukleotidene (adenin, tymin, cystin og guanin) i riktig rekkefølge slik at kopien blir komplementær til templatet. Adenin er komplementær til tymin, og cystin komplementær til guanin.

Hver syklus (trinn 1-3) gjentas ca. 20- 40 ganger. Flere hundre millioner kopier vil tilslutt være tilbake i løsningen. Kopieringen av DNA ved PCR skjer eksponentielt. Fra hvert templat oppstår det to kopier, som i sin tur er opphavet til to nye, og så videre [62].

Amplifiseringen (kopieringen) foregår i mikrorør eller brønner i spesielle maskiner (termosyklere) der temperaturen justeres automatisk etter programmet som er valgt av brukeren.

Real-time PCR er en modifisert metode av konvensjonell PCR som gir flere anvendelsesområder. Den viktigste forskjellen er at Real-time PCR muliggjør kvantifisering av DNA kopier i utgangsmateriale. Ved Real-time PCR blir amplikon detektert under amplifiseringen i et lukket system, som resulterer i kortere analysetid og redusert mulighet for

kontaminasjon. Spesielle luftkontrollerte rom er ikke nødvendig for Real-time PCR slik det er for konvensjonell PCR [63]. Dette medfører at teknologien er enkel å anvende for mange laboratorier.

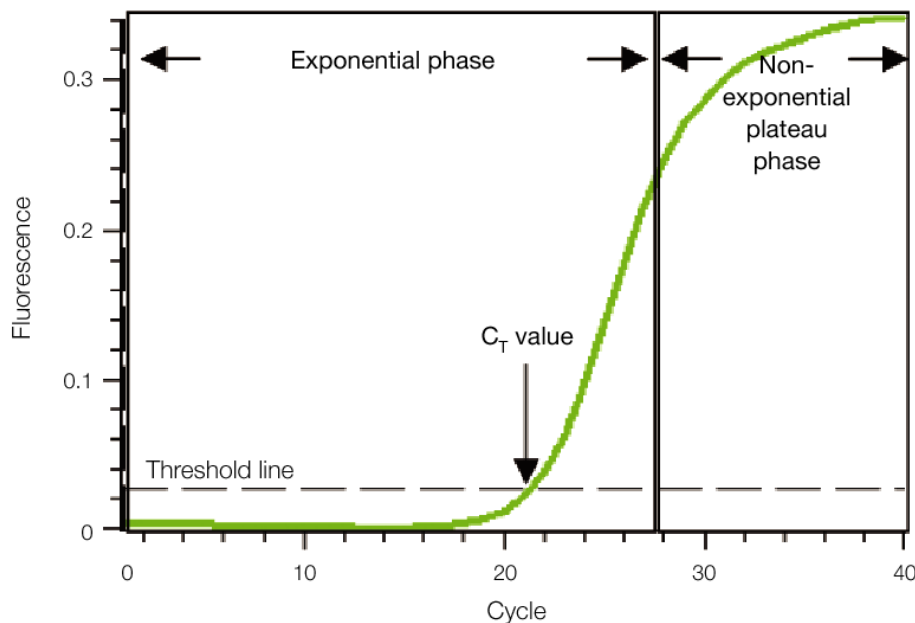
Figur 2 viser en amplifikasjonskurve fra en klassisk Real-time PCR kjøring. Kurven er plottet etter PCR-sykler på x-aksen og fluorescensintensitet fra amplifikasjonen på y-aksen.

Fluorescensintensiteten er proporsjonal med amplikonmengden i prøverøret.

Amplifikasjonsplottet viser to faser, en eksponentiell fase og en ikke eksponentiell fase, ofte kalt platå fase. I løpet av den eksponentielle fasen dobles mengden amplikon for hver syklus.

Etter hvert som reaksjonen pågår, forbrukes komponentene (for eksempel DNA polymerase eller primere) og en eller flere av dem blir en begrensende faktor. Når dette skjer vil reaksjonshastigheten falle og gå over i en platåfase (syklus 28-40 i Figur 2).

Fluorescenssignalet, ved de første syklusene (syklus 1-18 i Figur 2), vil være på nivå med bakgrunnsignalet (*non template control* - NTC), til tross for at det også her skjer en eksponentiell økning av amplikon. Mengden amplikon må overstige en terskel, *Threshold Line*, for at fluorescens kan detekteres. Brytningspunktet for amplifikasjonskurven og *Threshold Line* kalles *Threshold Cycle* (C_T), og blir angitt i syklusnummer [64].



Figur 2. Amplifikasjonsplott for en positiv prøve med Real-time PCR. Syklusnummerene til reaksjonen er vist på x-aksen, og fluorescensintensiteten på y-aksen (grønn kurve). Figuren er hentet fra BioRad.

Real-time PCR kombinerer konvensjonell PCR kjemi med fluorescensmerket probe(r), eller interkalerende fluorescens som binder seg uspesifikt til alt dobbelttrådet DNA (SYBR Green). Fluorescensmerket probe(r) har to store fordeler sammenlignet med interkalerende fluorescens. Uspesifikke produkter, som primer-dimer og lignende, vil ikke bli detektert. Den andre fordel er muligheten for multipleks PCR. Det vil si å påvise flere målgen i samme reaksjonsrør, ved hjelp av prober merket med forskjellig fluoroforer av ulik bølglengde [64]. SYBR Green er mindre kostbart, men kan være vanskelig å optimalisere.

TaqMan prober:

Proben er en enkelttrådet oligonukleotid (vanligvis 20-30 basepar) med en fluorescensmerket *reporter* i 5' enden og en *quencher* (slukker) i 3' enden. Den er designet til å hybridisere komplementært til templatet på en av trådene i mellom primerne. Basenukleotider kan ikke kobles til 3' enden til proben. Når proben er intakt vil fluorescens fra *reporter* (vanligvis kort bølglengde) være hemmet av *quencher* (vanligvis lang bølglengde). Dette kalles *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) [65]. Dersom proben hybridiserer til templatet, vil DNA polymerases (*Taq*) 5'→3' exonukleaseaktivitet kløyve proben, slik at *reporter* blir skilt fra *quencher*. FRET opphører, og resultatet blir et fluorescenssignal, fra *reporter*, som er proporsjonalt med mengde amplicon i reaksjonsrøret [64]. Dersom målgenet ikke er til stede i prøven forblir probene intakte. Real-time PCR instrumentet fortar vanligvis en avlesning etter hybridiseringstrinnet i hver syklus. Den mest brukte *reporter-quencher* kombinasjonen er *6-carboxyfluorescein* (FAM) og *Black Hole Quencher* (BHQ) [66].

Nukleinsyre-ekstraksjon innenfor mikrobiologi:

Et viktig preanalytisk steg for PCR er ekstraksjon. Nukleinsyren må gjøres tilgjengelig for PCR ved å lysere virusinfiserte celler, bakteriers cellevegger og membraner. Ulike prøvematerialer kan inneholde substanser som kan hemme PCR reaksjon og gi falske negative resultater [67]. Heme, galle, proteiner, alkoholer, sporstoffer og metaller er eksempler på slike substanser [57]. Det finnes i dag ulike kommersielle metoder for ekstraksjon, både manuelle og automatiserte. De fleste er basert på en teknologi med magnetiske glasspartikler, eller silika, som har høy affinitet til nukleinsyre. Prøvene blir først lysert, proteiner blir deretter brutt ned før en vaskeprosess settes i gang. Tilslutt elueres ren nukleinsyre.

2.3 Verifisering, validering og kontaminasjonskontroll

Nøkkelen til en god laboratorietest er å produsere nøyaktige og presise resultater over tid. Testen må være hurtig å utføre slik at resultatene er av klinisk nytte. Begrepene verifisering og validering brukes ofte om hverandre i litteraturen. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) har definert begrepene i dokumentet *Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases* MM3-A2 [63]:

- Verifisering er definert som en engangsprosess for å fastslå og bekrefte testens ytelse, før analysen brukes til testing av pasienter.
- Validering er en kontinuerlig prosess for å bevise at metoden, reagenser eller utstyr fungerer etter hensikten. Viktige faktorer for validering er kvalitetskontroll, testing av effektivitet, kompetanse hos analytiker, sammenliknende laboratorieprøving (SLP) og kalibrering av instrument.

2.3.1 Verifisering

Påliteligheten til verifiseringsdata avhenger av tre viktige faktorer: validiteten til metoden, instrumentets evne til å reprodusere resultater og tilstrekkelig opplæring av analytiker. Under grunnleggende krav i IVD-direktivet, er det opp til produsenten selv å finne hvor akseptabelt nivå ligger. Lynne M. Sloan har publisert anbefalinger for verifisering, validering og kontaminasjonskontroll for kvalitativ og kvantitativ Real-time PCR i klinisk mikrobiologi [63]. Anbefalingene er basert på retningslinjer fra CLSI for godkjenning av *Food and Drug Administration* (FDA) i USA. FDA krever, i likhet med EUs IVD-direktiv, verifisering av egenutviklede laboratoriemetoder som skal benyttes til diagnostikk. Verifiseringsparametre som må dokumenteres er nøyaktighet, presisjon, spesifisitet, hemming av PCR, måleområde og analytisk sensitivitet (*Limit of Detection*=LOD). Dokumentasjonen må lagres på laboratoriet så lenge analysen utføres og er gyldig såfremt det ikke gjøres vesentlige modifikasjoner som kan påvirke analyseresultatet. En standardisert PCR metode skal gi det samme resultatet av en prøve, enten den er repetert flere ganger, eller utført av forskjellige operatører. Det er alltid en mulighet for at forskjellige faktorer kan påvirke metoden og gi falske negative resultater [68]. Før verifisering av metoden, er det viktig å kjenne til en del begreper:

2.3.2 Nøyaktighet

Nøyaktigheten til en metode er påvirket av systematiske eller tilfeldige (presisjon) feil. Imidlertid blir nøyaktighet ofte beskrevet som den systematiske feilen. Den systematiske feilen er avstanden mellom testresultatet og sann verdi. For å kunne angi sann verdi, må en gullstandard metode være tilgjengelig. Ofte mangler slike metoder innen klinisk mikrobiologi, eller har de lav sensitivitet. Nøyaktighet kan også uttrykkes som diagnostisk sensitivitet og spesifisitet [63].

2.3.3 Presisjon

Presisjon er variasjon i en måleserie, eller mellom måleserier, til en replikert prøve under foreskrevet reaksjonsbetingelser. Repeterbarhet uttrykker presisjonen under de samme reaksjonsbetingelsene over et kort tidsintervall. Det blir også kalt *within-run* presisjon og blir ofte oppgitt som *intra-assay* presisjon i eksperimenter. Intermediær presisjon er den totale presisjonen under varierende reaksjonsbetingelser. Den blir også omtalt som variasjoner *within-laboratory* som f. eks. ulike dager, operatører, utstyr etc. Intermediær presisjon blir ofte oppgitt som *inter-assay* presisjon i eksperimenter. Intermediærpresisjon må ikke forveksles med reproduserbarhet som uttrykker presisjonen mellom laboratoriene (*between-laboratory*) [69].

2.3.4 Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet refererer til deteksjon av DNA med PCR fra bakteriekolonier, eller kontrollstammer, som ikke er påvirket av biologisk materiale. Diagnostisk sensitivitet refererer til deteksjon av DNA med PCR i et biologisk materiale. Sensitivitet kan oppgis som LOD [70]. Dette er den laveste konsentrasjonen DNA som kan påvises med en Real-time PCR analysemetode.

2.3.5 Analytisk spesifisitet

Analytisk spesifisitet er en testparameter for å verifisere at primerne i analysemetoden ikke krysshybridiserer med nukleinsyre fra andre arter og gir falske positive resultater. Det anbefales to måter å teste analytisk spesifisitet på. Den ene er å analysere et panel, bestående av beslektede arter og mikrober fra samme tilholdssted, med den aktuelle Real-time PCR

metoden [63]. Den andre måten er å søke etter homologe sekvenser til målgenet eller primernes og probenes eksklusivitet ved hjelp av verktøyet *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) fra *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [71].

2.3.6 Validering

Analysens evne til å produsere gjentagende nøyaktige og presise resultater er selve kjernen i kvalitetstesting. Forandringer i reagenser, instrumenter, kontroller og analytikers kompetanse kan påvirke denne kvaliteten. En valideringsrapport må utarbeides og inneholde dokumentasjon av valideringen.

2.3.7 Effektivitet

Amplifikasjonens effektivitet undersøkes ved å analysere en fortynningsserie av målgenet. Amplifikasjonskurvene vil fordele seg med lik avstand mellom hver fortynning ved optimal effektivitet. Effektivitetstesting brukes først og fremst ved kvantitativ Real-time PCR, men den gir også nyttig informasjon om repeterbarhet og robusthet for kvalitative analyser. Amplifikasjonens effektivitet er beregnet utfra standardkurves stigning med følgende formel:

$$\text{Effektivitet (E)} = 10^{-1/\text{stigningstall}}$$

Teoretisk vil mengden amplikon dobles for hver PCR syklus. Avstanden mellom fluorescensekurvene i en fortynningsserie med perfekt amplikon dobling beregnes med formelen:

$$\text{Fortynningsfaktor} = 2^n$$

n = antall sykler (C_T) mellom fluorescensekurvene.

I en 10-folds fortynning skal avstanden mellom kurvene teoretisk være 3,32 sykler.

Effektiviteten kan også oppgis i prosent med formelen:

$$\text{Effektivitet \%} = (E - 1) \times 100 \%$$

Effektiviteten til amplifikasjonen bør ligge mellom 90-110 % ($-3,6 > \text{stigningstall} > -3,1$) [64, 72].

2.3.8 Kontroller

Kontroller brukes for å overvåke alle faktorer som kan påvirke analyseprosessen [71]. Ideelt sett burde kontrollene være i samme miljø som hvert enkelt prøvemateriale, fra preparering til resultat. Dette vil være svært upraktisk og tidkrevende å gjennomføre slik at kompromisser må gjøres. For en kvalitativ Real-time PCR analyse vil én positiv kontroll pr. oppsett være tilstrekkelig. Konsentrasjonen bør være ned mot LOD. En kontroll med høy konsentrasjon av DNA kan lett kontaminere ("carry over") andre prøver i oppsettet og gi falske positive resultater. Negativ kontroll inneholder nukleinsyre, men ikke sekvensen til målgenet. NTC består kun av nukleasefritt vann eller buffer, og kalles en blank kontroll. Den kan anvendes for å avsløre om det er forurensing i reagensene eller et forhøyet bakgrunnsignal av fluorescens i analysen [63].

2.3.9 Intern hemmerkontroll (IC)

IC brukes for å avsløre om prøvematerialet inneholder forbindelser som kan hemme amplifikasjonen. Mengden av inhibitorer varierer mellom ulike typer prøvematerialer. IC kan sløyfes dersom det er lite hemmere i et prøvemateriale [57]. En endogen IC er et templat som finnes naturlig i prøvematerialet som blir analysert. *16S rRNA*, *18S rRNA* og andre husholdningsgener er ofte brukt til dette formålet, men konsentrasjonen av disse vil variere fra prøve til prøve, og vil i mange tilfeller være svært høy [73]. En eksogen IC tilsettes prøven før eller etter ekstraksjonen. Deretter utføres en koamplifikasjon (dupleks PCR) med målgenet i samme reaksjon. Ideelt sett bør IC-templat hybridisere til de samme primerne som målgenet slik at amplifikasjonsbetingelsene blir mest mulig lik. Ulempen er at dette kan føre til en konkurranse om primerne med målgenet som kan resultere i en lavere effektivitet av amplifikasjonen og analytisk sensitivitet. Et annet alternativ er å bruke ikke konkurrerende IC templat der målgen og IC blir amplifisert med forskjellig primersett. Ulempen er at amplifikasjon av IC ikke reflekterer amplifikasjonen til målgenet på samme måte som en konkurrerende IC [74]. Konsentrasjonen av kontrollen må være meget liten for at små mengde hemmere kan avsløres.

2.4 Målgen

MgpB genet finnes i en fullstendig kopi, men har en hypervariabel sekvens.

Det er etablert Real-time PCR metoder med ulike *MgPa* sekvenser som målgen, men på grunn av stor genetisk variasjon mellom forskjellige stammer, kan disse gi falske negative resultater [27, 31, 75]. *16S rRNA*-genet er ofte brukt til påvisning av *M. genitalium* [8, 19, 75]. Det er to store ulemper ved bruk av dette genet. *16S rRNA* til *Mycoplasma genitalium* og *Mycoplasma pneumoniae* har en likhet i sammensetningen av basesekvens på 98 % [6]. Dessuten er 16S rRNA genene kjent for å danne sekundærstrukturer slik at sensitiviteten går ned [12].

Husholdningsgenet, *glyceraldehyde-3-phosphate (gap)*, koder for et viktig metabolsk enzym i glykolysen (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*=GAPDH) [76]. Det finnes kun én kopi av genet i genomet til *M. genitalium*. Genet antas for å være relativt konserververt og forskjellig fra homologe gener fra andre arter. Det har en likhet i sammensetningen av basesekvenser med *M. pneumoniae* på 72 % [13].

3 Materiale og metode

3.1 Prøvemateriale

I denne studien er retningslinjene for prøvetaking av kliniske prøver til *C. trachomatis* PCR (COBAS TaqMan CT Test, Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, NJ, USA) fulgt.

3.1.1 Retningslinjer for prøvetaking

For nukleinsyrebaserte metoder anbefales første urinporasjon (FVU-*first voided urine*) fra pasienter med mistanke om urogenital *M. genitalium* infeksjon. De første 5-10 ml samles i et sterilt polypropylen plastrør [77]. For kvinner anbefales både FVU og prøvemateriale fra cervix tatt, med *STD Swab Specimen Collection and Transport Set* (Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, NJ, USA) [77, 78]. En tykk pensel som medfølger, brukes til å fjerne eventuelt slim eller puss fra cervix. Den tynne penselen skrapes mot cervix for å fange opp celler. Penselen settes opp i transportbufferrøret og blandes i ca. 20 sekunder. Tilslutt skvises væsken fra penselhodet mot den innvendige kanten av transportrøret. Prøven i transportrøret er holdbar i sju dager ved romtemperatur. Urinprøven er holdbar inntil 24 timer ved romtemperatur, og fire dager ved kjøleskapstemperatur (2-8 °C), inntil ekstraksjon [77]. Nedfrysing av urinprøver ved – 20 °C, spesielt fra kvinner, er ikke anbefalt ettersom om lag 20 % av PCR positive *M. genitalium* blir negative etter fryse-tine prosessen [78]. Det er mottatt 20 kjente positive *M. genitalium* prøver fra FÜRST Medisinsk Laboratorium. FÜRST har de samme retningslinjene for prøvetaking som er nevnt for dette eksperimentet <http://www.furst.no/bb/index6.html>.

3.1.2 Forbehandling og ekstraksjon

En oppkonsentrering av urinprøvene ble utført før ekstraksjon [79]. 1 ml urin ble overført til et mikrorør (1,5 ml Polypropylen, Sarstedt, Numbrecht, Tyskland) og sentrifugert ved 21 000 x g i 10 minutter (*Biofuge Primo*, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA). 800 ml supernatant ble fjernet før pelletten ble løst på whirlmikser. Ekstraksjon av både cervikalt sekret og de preparerte urinprøvene, ble utført med det helautomatiske *MAGNA Pure LC* instrumentet (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland).

Reagenser:

MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland).

Program:

Total NA Variable_Elution_Volume

Prøvevolum:

200 µl

Elueringsvolum:

100 µl

3.2 Kontrollmateriale

En fortyning av *Mycoplasma genitalium* G37, ATCC 33530 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), er brukt som positiv kontroll. Det frysetørrete materialet ble løst i ca. 2 ml nukleasefritt vann (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Ekstraksjon ble deretter utført med *MagNA Pure LC*. Nukleasefritt vann er brukt som blank kontroll (NTC). En fortyning av klonet *MS2* DNA (TIB-Molbiol, Berlin, Tyskland) er brukt som en ikke konkurrerende IC [80]. Tørrstoffet er løst i nukleasefritt vann til en konsentrasjon på 1×10^8 bakteriegenomer/µl.

3.3 Primer og probe design

PCR primere i den publiserte artikkelen fra Svenstrup *et al.* for påvisning av *gap*-genet til *M. genitalium* (*National Center for Biotechnology Information*, aksjonsnummer L43967, gov) er brukt som utgangspunkt [9]. To alternative primere og en TaqMan probe ble på forespørsel designet av Olfert Landt ved TIB-Molbiol. Primere og probe til *MS2* DNA Real-time PCR er designet av TIB-Molbiol. En sammenlignende Real-time PCR analyse for påvisning av *16S rRNA*-genet hos *M. genitalium* er brukt med de samme betingelsene som i den publiserte artikkelen til Jurstrand *et al.* [8]. Alle primerne og probene er produsert og levert av TIB-Molbiol. De frysetørrete primerne og probene er løst i nukleasefritt vann til stockløsninger på 100 µM.

Tabell 1. Primer og probesekvenser for påvisning av *Mycoplasma genitalium* G37 DNA.

Aksesjonsnummer *gap* gen: L43967, gi: 84626123. Aksesjonsnummer *16S rRNA* gen: X77334 og gi: 459531 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) og phage MS2 DNA (IC).

Oligonukleotid	<i>Mycoplasma genitalium</i> , glyceraldehyde-3-phosphate (<i>gap</i>) gen	L43967, X77334
Mgen01 – Forward	5' GCTTGATTTACTTGTTC AACAGATGGAC-3'	371170 - 371197
Mgen 02 – Reverse	5' GTGCTCGTGCTGCAGCTGT-3'	371359 – 371341
Mgen A – Reverse	5' CAACAACAACAGGAGCAGCTAA-3'	371329 – 371308
Mgen B – Reverse	5' AACGCTTACAAGATGCTCCTCATA-3'	371395 - 371372
MgGAP TM- Reverse	5' FAM ^a -TCCAGAAGCAAATGGCAAACCTTAATGGG- BBQ ^b -3'	371289 - 371262
MG16-45 – Forward	5' TACATGCAAGTCGATCGGAAGTAGC-3'	45-69
MG16-47 - Reverse	5' AA ACTCCAGCCATTGCCTGCTAGA-3'	469-447
Mg16S-FL – Reverse	5' AATAACGAACCCTTGCAGGTCCTTTCAACTT-FL ^c -3'	213-183
Mg16S-LC – Reverse	5' LC640 ^d -AATTCATGCGAACTAAAGTTCTTATGCGGTATTAGCT-3'	181-145
MS2 – Forward	5' TGCTCGCGGATACCCG -3'	
MS2 – Reverse	5' AACTTGCGTTCTCGAGCGAT -3'	
MS2-TM – Forward	5' Texas Red-ACCTCGGGTTCCGTCTTGCTCGT- BBQ ^b 3'	

^a 6-carboxyfluorescein

^b Black Berry Quencher

^c Fluorescein

^d LightCycler RED 640

Tabell 2. Lengden til forskjellige amplikonsekvenser, i antall basepar, for *gap*, *16S rRNA* gen (*M. genitalium*) og MS2 DNA (IC).

Primere	Amplikon lengde:
Mgen 01- Mgen 02:	190 basepar
Mgen 01- Mgen A:	139 basepar
Mgen 01- Mgen B:	226 basepar
MS2 F- MS2 R:	61 basepar
16S F- 16S R:	425 basepar

All amplifikasjon, deteksjon og data analysering er utført med *LightCycler 480* (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) i 96 brønners plateformat.

Standardbetingelser:

Retningslinjene fra *LightCycler Technical Note* anbefaler følgende betingelser for PCR oppsett som ikke er optimalisert:

Tabell 3. Oversikt over konsentrasjonen av reagenser i PCR-miks ved standardbetingelser. Totalvolum 20 µl.

Reagenser	Konsentrasjon
<i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland)	
25mM MgCl ₂	5 mM
FastStart <i>Taq</i> DNA polymerase, reaksjonsbuffer, deoksynukleosid trifosfat (dUTP i stedet for dTTP)	1x
Primere (Mgen og MS2)	0,5 µM
Prober (MgGAP-TM og MS2-TM)	0,2 µM
UNG (Uracil-N-Glycosylase, Eurogentec S.A, Belgia)	0,5 U
MS2 DNA templat, 100 plasmidkopier/ µl	5 µl

15 µl av primermiksen og 5 µl eluat ble tilsatt brønnene i reaksjonsbrettet (AB70659, BIOplastics, Landgraaf, Nederland) og forseglet med *EU-Opti-Seal* (BIOplastics, Landgraaf, Nederland). Hvert oppsett inneholdt NTC og en positiv kontroll.

Tabell 4. Standardbetingelser for amplifikasjonsprogram på LightCycler 480.

	Temperatur	Tid
UNG aktivering	50 °C	2:00
FastStart Enzym	95 °C	10:00
Denaturering	95 °C	} 45 sykluser
Hybridisering	60 °C	
Elongering	72 °C	
Avkjøling	40 °C	0:20

3.3.1 Primer-dimer test

2,0µl *SYBR-green I* (10x konsentrasjon, Invitrogen, Oregon, USA) ble tilsatt PCR-miksen. Den templatfrie testen ble analysert i triplikat med standardbetingelser for amplifikasjonsprogram (Tabell 4) og reagenskonsentrasjoner (Tabell 3). TaqMan proben (MgGAP-TM) ble erstattet med vann i reaksjonsbrønnen til positiv kontroll (*M. genitalium* G37 DNA, 24 bakteriegenom/µl).

3.3.2 Valg av revers-primer

De ble satt opp primer-dimer undersøkelse for hver av de tre revers-primerene og gjort en sammenligning av uspesifikke reaksjoner fra resultatene. Et BLAST søk ble utført for å sjekke spesifisiteten til hver enkelt primer.

3.4 Optimalisering

Retningslinjer fra *LightCycler Technical Note* er fulgt [81]. Dette er et forslag over en trinnvis optimaliseringsprosedyre for å oppnå best mulig reaksjonsbetingelser for analysen. En primer-dimer test er utført før og etter optimalisering av reaksjonsbetingelsene.

Sluttkonsentrasjonen av Mg^{2+} er titrert i et område fra 3,0-5,0 mM. Det ble satt opp 5 replikater for 3,0, 4,0 og 5,0 mM. Standardbetingelser for konsentrasjonen av de øvrige reagensene og amplifikasjonsprogram er brukt.

Sluttkonsentrasjonen av primerne er titrert i et område fra 0,5-1,0 μM . Det ble satt opp 5 replikater for 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 og 1,0 μM . Eksperimentet er utført med standardbetingelser og optimalisert Mg^{2+} konsentrasjon.

Sluttkonsentrasjonen av TaqMan proben er titrert i et område fra 0,2-0,4 μM . Det ble satt opp 5 replikater for 0,2, 0,3 og 0,4 μM . Eksperimentet er utført med standardbetingelser og optimalisert Mg^{2+} - og primerkonsentrasjon.

Gradering av hybridiseringstemperaturen er utført fra 55,0-65,0 $^{\circ}\text{C}$. Det ble satt opp 4 replikater for 55,0, 60,0 og 65,0 $^{\circ}\text{C}$. Eksperimentet er utført med standardbetingelser og optimalisert Mg^{2+} -, primer- og probekonsentrasjon.

3.5 Verifisering

IC (250 plasmidkopier/PCR reaksjon *MS2* DNA) er med i alle verifiseringseksperimentene.

3.5.1 Stabilitet

Holdbarheten til primermiksen ble undersøkt etter tillaging og etter 7 måneder med triplikater av en *M. genitalium* G37 stamme (ca. 238 bakteriegenom/ μl). Primermiksen ble oppbevart mørkt ved 2-8 $^{\circ}\text{C}$ og kontrollstammen ved < -18 $^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 Analytisk sensitivitet

Ufortynnet *M. genitalium* G37 DNA ble ekstrahert med MagNA Pure LC. For å beregne total mengde DNA i eluatet ble optisk tetthet (OD) målt ved 260 nm med NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Saveen & Werner AS, Sverige). I alt 10 replikater ble utført med 2 μl eluat som testvolum. Molekylantallet ble beregnet og fortynnet i henholdsvis nukleasefritt vann, en blanding av negative uriner og en blanding av endocervikale prøver. Eksperimenter med måleserier av 20 replikater av *M. genitalium* G37 ble utført.

3.5.3 Analytisk spesifisitet

Bakteriene og gjærsoppisolatet ble dyrket på agarskåler (*Blood Agar Base No 2*, Oxoid, Hampshire, England) med saueblod (Fisher Scientific, Oslo, Norge) og inkubert aerobt ved 35 $^{\circ}\text{C}$ i 2 døgn. *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae* og *Bacteroides fragiles* ble dyrket

på Columbia agar (*Columbia Blood Agar Base* med *Vitox*, Acumedia Manufactures Inc., MI) med hesteblood (Fisher Scientific, Oslo, Norge) og inkubert ved 36 °C i 5 % CO₂ eller anaerobt ved 36 °C i 5 døgn. Alle agarskålene ble produsert av Substratslaboratoriet, Enhet for mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF (SSHF). Koloniene ble høstet med 1 µl plastøse og løst i 500 µl nukleasefritt vann i mikrorør. Pasientprøvene som inneholdt *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae* og *Chlamydophila pneumoniae* ble påvist med PCR av SSHF. Ekstraksjon ble utført med programmet: *Total NA Variable_Elution_Volume* med *MagNA Pure LC* instrumentet. Herpes Simplex Virus I og II er kommersielle DNA kontroller klare til bruk (Vircell, Granada, Spania).

3.5.4 Nøyaktighet

Eksperimentene for nøyaktighet er utført ved å bruke hele testsystemet, fra prøvepreparering til resultat. Testing av nøyaktighet krever, ifølge retningslinjene til Sloan, L. M [63], et panel med 50 positive og 50 negative prøver. Ved mangel på positive pasientprøver gir retningslinjene rom for å tilsette positivt kontrollmateriale i negativt prøvemateriale for å simulere en positiv pasientprøve. Et panel med 25 *M. genitalium* PCR positive og 25 negative urinprøver, samt et tilsvarende panel med endocervikale prøver, er undersøkt for målgenet (*gap*) og en sammenlignende analyse (*16S rRNA*) [8]. For den sammenlignende analysen er det brukt standardbetingelser av reagenser og PCR programmet som er angitt i publikasjonen. 15 av urinprøvene og fem av prøvene fra cervix er mottatt fra Fürst Medisinsk Laboratorium og betraktet som sanne positive. Fire urinprøver er bekreftet positive med to forskjellige Real-time PCR analyser (*gap* og *16S rRNA*) av SSHF. 6 urinprøver og 20 endocervikale prøver er tilsatt ulike konsentrasjoner av *M. genitalium* G37 DNA (ATCC 33530) for å simulere positive prøver. 50 negative prøver er først testet med den sammenlignende analysen.

3.5.5 Presisjon

Fem replikater av to konsentrasjoner med *M. genitalium* G37 ble testet. For å simulere de aktuelle prøvematerialene testsystemet skal godkjennes for, ble *M. genitalium* G37 tilsatt en ”pool” med 20 urinprøver og 20 endocervikale prøver. Prøvene var på forhånd ekstrahert i *MagNA Pure LC* og testet negativ med PCR (*gap*). Presisjonen i øvre og nedre konsentrasjonsområde ble testet (ca. 23 800 bakteriegenom/µl og ca. 24 bakteriegenom/µl).

3.6 Validering

3.6.1 Robusthet ved volumendringer

Produsenten av *FastStart DNA Master* anbefaler å bruke 15 µl PCR-miks og 5 µl templat til PCR reaksjonen på *LightCycler*. Det ble utført et eksperiment for å undersøke om ulike volum av PCR-miks og eluat kan påvirke resultatet. Til et fast volum PCR-miks (15 µl), ble det tilsatt 1, 3, 5, og 10 µl av en positiv *M. genitalium* G37 kontroll (ca. 24 bakteriegenom/µl) for ikke biologisk materiale, urin og cervikalt sekret. Til henholdsvis 5, 10 og 20 µl PCR-miks, ble det tilsatt 5 µl positiv kontroll for ikke biologisk materiale, urin og cervikalt sekret. Forsøkene ble gjentatt to ganger påfølgende dager.

3.6.2 Effektivitet

10-folds fortyninger med fem konsentrasjoner av ekstrahert *Mycoplasma genitalium* G37, ATCC 33530, er brukt for å teste effektiviteten til amplifikasjonen. Konsentrasjonen strakk seg fra ca. 238 000 til ca. 24 bakteriegenom/µl. Effektiviteten er også testet i prøvematerialene, urin og cervikalsekret, som analysen skal godkjennes for. En ”pool” av 20 *M. genitalium* PCR negative urinprøver, 20 PCR negative endocervikale prøver og nukleasefritt vann ble brukt som fortynningsvæske til hver av de tre måleseriene som ble lagd. Triplikater av hver fortykning ble analysert med optimaliserte betingelser. Beregningene av stigningstall og effektivitet ble utført automatisk av programvaren til *LightCycler 480*.

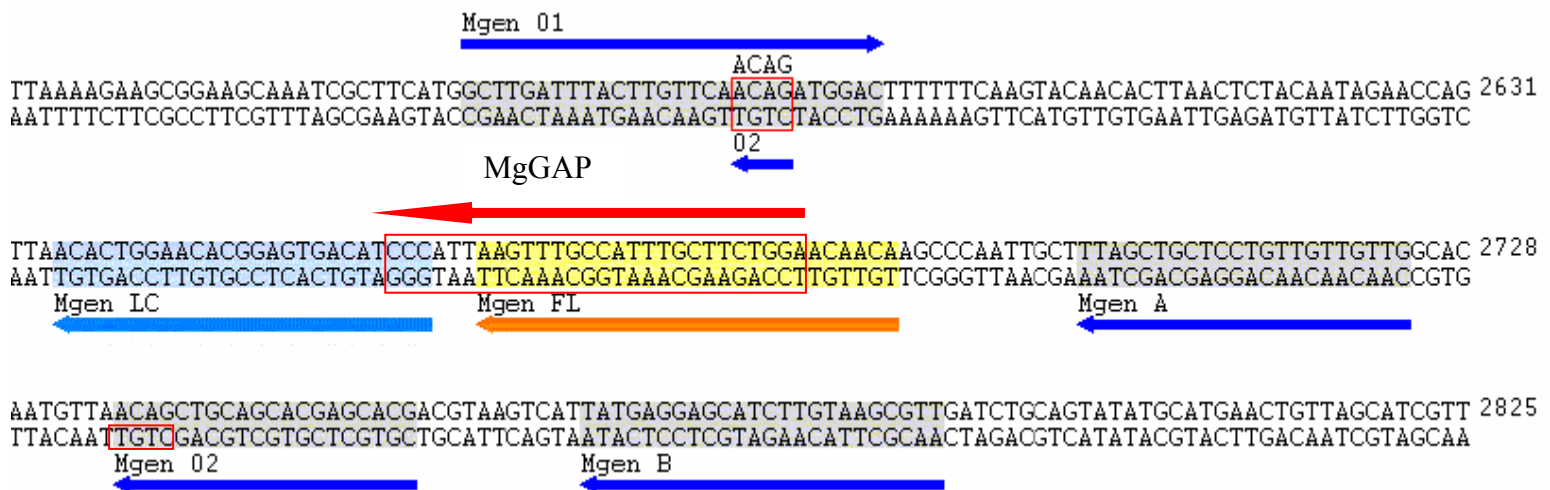
3.7 Statistikk

Paret T-test er brukt for å teste primermiksens stabilitet etter oppbevaring. Enveis ANOVA er brukt for teste robustheten til volum i PCR reaksjonen. Tukey test er brukt som oppfølgingstest. Data i målingene antas å være normalfordelte, og beregningene er utført med *Analyze-It* i Excel.

4 Resultater

4.1 Primervalg

I publikasjonen til Svenstrup *et al.* [9] er det designet et primerpar, 01 og 02, som ikke er optimalt. Figur 3 viser en sekvens der fire baser fra primer 02 er komplementær til primer 01. Uspesifikke bindinger (primer-dimer), som er tilfelle med primerparet 01 og 02, kan redusere mengden av primere/prober som er tilgjengelig for PCR reaksjonen og gi en redusert yteevne. To alternative revers primere (A og B), og primer 02, ble undersøkt for primer-dimer dannelse. Resultatet viste amplifikasjonskurver med gjennomsnitt C_T -verdi på ca. 34 for primer 02. Ingen kurver ble påvist for primer A og B. Ettersom amplifikasjonskurver indikerer dannelse av primer-dimere, ble primer 02 forkastet. BLAST søk (01. desember 2008) viste ingen forskjell i spesifisitet mellom primer A og B. Forsøk med høy og lav konsentrasjon av positivt kontrollmateriale viste det samme bilde for begge primerne. Primer B er brukt til de andre eksperimentene i denne studien.



Figur 3. Bindingssteder for primere og prober på *gap* genet til *Mycoplasma genitalium* G37 (aksesjonsnummer: L43967, gi: 84626123). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Mgen 01, Mgen 02, Mgen LC og Mgen FL er oligonukleotider fra publikasjonen til Svenstrup *et al.* Mgen A, Mgen B og MgGAP er oligonukleotider designet av O. Landt ved TIB-Molbiol.

4.2 Optimalisering

Tabell 5. Optimalisering av Mg²⁺-ion, hybridiseringstemperatur, primer- og probekonsentrasjon for påvisning av *M. genitalium* DNA med IC. Eksperimentet er utført på LightCycler 480.

MgCl ₂	Gjennomsnitt C _T -verdi ± SD (n=5)	Fluorescensintensitet Manuell avlesning
3,0 mM	31,10 ± 0,40	Ca. 4-13
4,0 mM	30,20 ± 0,44	Ca. 7-17
5,0 mM	29,84 ± 0,34	Ca. 5-26
Primerkonsentrasjon		
0,5 µM	30,38 ± 0,26	Ca. 14-18
0,6 µM	30,23 ± 0,35	Ca. 14-20
0,7 µM	29,98 ± 0,78	Ca. 6-28
0,8 µM	29,81 ± 0,26	Ca. 14-28
0,9 µM	29,62 ± 0,15	Ca. 13-28
1,0 µM	29,52 ± 0,24	Ca. 22-28
Probekonsentrasjon		
0,2 µM	34,85 ± 1.51	Ca. 4-21
0,3 µM	34,06 ± 0,33	Ca. 12-20
0,4 µM	33,31 ± 0,31	Ca. 16-25
Hybridiseringstemperatur		
55,0 °C	31,58 ± 0,39	Ca. 7-9
60,0 °C	31,02 ± 0,18	Ca. 8-10
65,0 °C	31,81 ± 0,09	Ca. 6-7

C_T = Cycle Threshold

SD= Standard Deviation

Ved å øke konsentrasjonene av primere, probe og Mg^{2+} -ioner kan sensitiviteten og fluorescensintensiteten forbedres. Blir konsentrasjonen for høy, vil mengden uspesifikke bindinger tilta, og redusere effektiviteten. For lave konsentrasjoner vil imidlertid føre til redusert effektivitet på grunn av underskudd av reagenser som gir en dårligere hybridisering [64]. Ingen primer-dimer ble påvist med SYBR-green, hverken før eller etter optimalisering. Positiv kontroll (eksklusiv probe) viste forventet resultat. Analysen viste seg ikke å være sårbar for uspesifikke bindinger ved relativt høye konsentrasjoner av oligonukleotider og Mg^{2+} -ioner. Konsentrasjonene av primere og probe ble justert opp fra henholdsvis 0,5 μM og 0,2 μM , som er standardbetingelser i retningslinjene fra *LightCycler Technical Note*, til 1,0 μM og 0,4 μM [81].

4.3 Validering

4.3.1 Stabilitet

Tabell 6. Oversikt over holdbarheten til egenutviklet primermiks, før og etter henstand i kjøleskap (2-8 °C).

<i>M. genitalium</i> G37 (Ca. 238 bakteriegenom/ μl)	Gjennomsnitt C_T -verdi \pm SD (n=3)
Nylaget primermiks	31,36 \pm 0,15
Etter 7 måneder	32,76 \pm 0,35

C_T = Cycle Threshold

SD= Standard Deviation

Paret T-test viser at primermiksene ikke gir noen signifikant forskjell ($p < 0,005$) av C_T -verdiene etter 7 måneders oppbevaring i kjøleskap (2 °C).

4.3.2 Analytisk sensitivitet

Kvantitering av *M. genitalium* G37 med NanoDrop 1000 Spectrophotometer:

Tabell 7. Ti parallelle konsentrasjonsmålinger av *M. genitalium* G37 DNA med NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Saveen & Werner AS, Sverige) ble brukt for å beregne total mengde DNA i eluatet.

Måling nummer	ng/ul
1	12,53
2	11,79
3	12,55
4	13,61
5	14,19
6	14,62
7	15,83
8	14,86
9	16,48
10	12,92
Gjennomsnitt ng/ul	13,94
Variasjonskoeffisient (CV %)	11,0

Innhold av DNA molekyler i uforynnnet *M. genitalium* G37 kontroll:

Avogadros konstant: $6,022 \times 10^{23}$ molekyler/mol.

Estimert molekylvekt for dobbeltrådet DNA: $(\neq \text{nukleotider} \times 607,4) + 157,9^*$ [82].

Genomstørrelse *M. genitalium*: 580 076 nukleotider.

$$\frac{6,022 \times 10^{23} \text{ molekyler/mol} \times 13,938 \text{ ng/}\mu\text{l}}{(580\,076 \times 607,4) + 157,9 \text{ g/mol}} = \underline{23\,825\,589 \text{ molekyler/}\mu\text{l} \text{ eller bakteriegenom /}\mu\text{l}}$$

*Indikerer molekylvekten til 5' trifosfat.

Tabell 8. Oversikt over eksperimenter for angi LOD (analytisk sensitivitet) i ulike matriser.

<i>M. genitalium</i> G37		Bakteriegenom/PCR reaksjon (20 µl)	Ikke biologisk materiale		Cervikalt- sekret (n=20)	Urin (n=20)
Fortynning	Bakteriegenom/µl		(n=20) Uten IC	(n=20)		
1:10 ⁻⁶	23,8	119	20	20	20	20
7:10 ⁻⁷	16,1	81	20	20	20	20
5:10 ⁻⁷	11,8	59	20	20	20	20
3:10 ⁻⁷	7,1	35	20	20	20	20
1:10 ⁻⁷	2,4	12	13	17	15	18
1:10 ⁻⁸	0,2	1	2	3	2	3

Resultatene av måleseriene viste en deteksjonsgrense for den egenutviklede analysen ned til 0,2 bakteriegenom/µl eller 1 bakteriegenom/reaksjon. Grensen der alle replikatene ble positive er 60 bakteriegenom/reaksjon.

4.3.3 Analytisk spesifisitet:

Stammene som ble valgt for å teste den analytiske spesifisiteten er enten nært beslektet med *M. genitalium* eller tilhører floraen i urogenitaltraktus (Tabell 9). Resultatene viste at primerne og proben i analysen er spesifikke for *M. genitalium* siden ingen kryssreaksjoner med stammene i panelet ble påvist.

Tabell 9. Liste over DNA fra mikrober brukt til undersøkelse av analytisk spesifisitet.

Mikrobe	Kode	Real-time PCR resultat		
		16S rRNA	gap	IC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-	-	+
<i>Enterococcus faecium</i>	CCUG 36804	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	NCTC 60	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-	-	+
<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC 23114	-	-	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531	-	-	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ABI 08-946-250	-	-	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ABI 08-932-250	-	-	+
<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 8467	-	-	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 49226	-	-	+
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018	-	-	+
<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053	-	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	-	-	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCUG 29780	-	-	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	-	-	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	-	-	+
Herpes simplex virus type I	Vircell 07MBC023003	-	-	+
Herpes simplex virus type II	Vircell 07MBC024003	-	-	+
<i>Chlamydia trachomatis</i> ¹	10 pasientprøver	-	-	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ²	5 pasientprøver	-	-	+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> ²	5 pasientprøver	-	-	+

¹ 5 urin- og 5 endocervikaleprøver bekreftet positive med *Cobas TaqMan 48*, Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland (SSHF).

² 5 luftveisprøver bekreftet positive med *iCycler*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA (SSHF).

ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

CCUG - Culture Collection, University of Göteborg, Sverige

NCTC - National Collection of Type Cultures, Colindale, London, UK

ABI - Advanced Biotechnologies Inc, Columbia, MD, USA

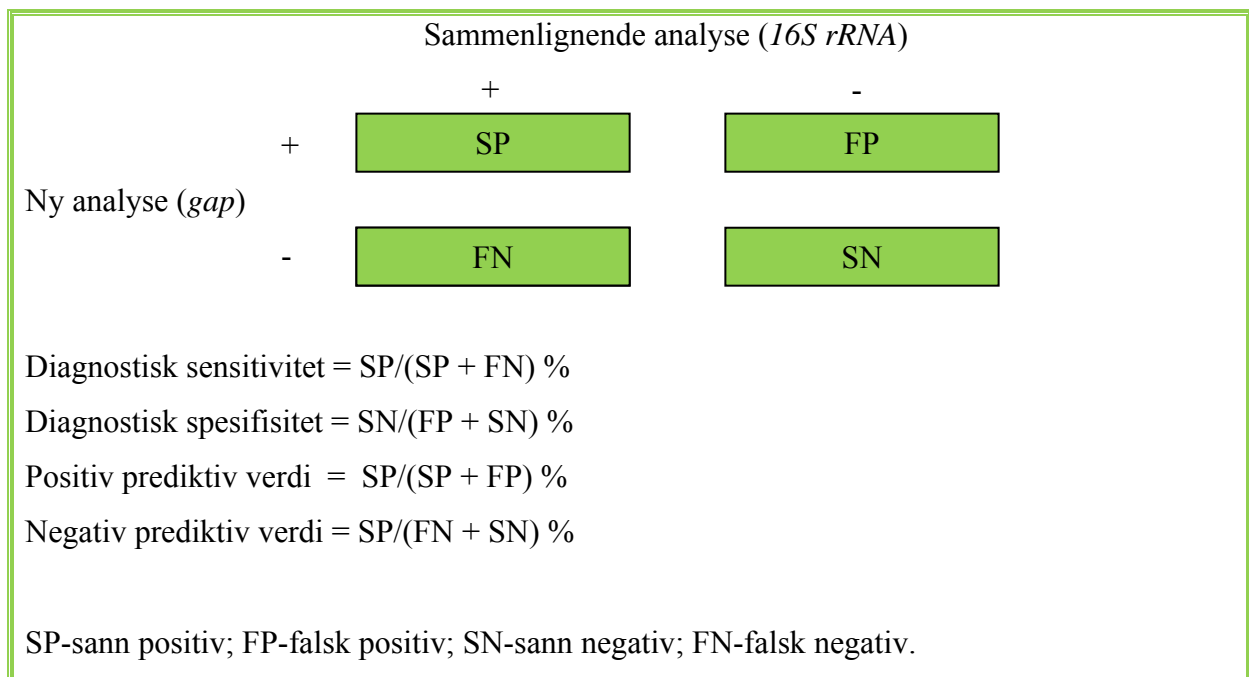
Vircell, Granada, Spania

4.3.4 Nøyaktighet

Resultatene fra eksperimentet for nøyaktighet (Tabell 10) viste positivt resultat for alle prøvene i panelet med den egenutviklede analysen (*gap*). Med den sammenlignende analysen (*16S rRNA*) viste fire av prøvene i panelet negativt resultat. For den egenutviklede analysen gir dette en diagnostisk sensitivitet, spesifisitet, positiv og negativ prediktiv verdi på 100 % (Figur 4). For den sammenlignende analysen er diagnostisk sensitivitet, spesifisitet, positiv og negativ prediktiv verdi henholdsvis 90, 100, 100 og 82 %. IC var negativ for 3 av de 4 prøvene med høyest konsentrasjon (23 800 bakteriegenom/ μ l) av *M. genitalium* templat, men aktiviteten av hemmere er uten relevans når målgenet er påvist.

Et panel med 50 negative urin og endocervikale prøver ble analysert med den egenutviklede analysen. Resultatene viste full overensstemmelse med panelet (resultatene er ikke vist).

IC var negativ for to av urinprøvene. Prøvene ble fortynnet 1:5 i nukleasefritt vann som resulterte i positiv IC og DNA negativ *M. genitalium* ved gjentatt kjøring.



Figur 4. Oversikt over ulike måter å uttrykke nøyaktighet.

Tabell 10. Panel av DNA positive *M. genitalium* prøver fra urin og cervikalt sekret. Prøvene fra Først Medisinsk Laboratorium er påvist med metoden til Jensen *et al.* [7] (*MgPa* gen).

DNA positive <i>M. genitalium</i> prøver:		Sammenlignende analyse:	Egenutviklet analyse:	
Prøvenr.	Urinprøve fra pasient med uretritt	<i>16S rRNA</i> Jurstrand <i>et al.</i>	gap	IC
1	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
2	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
3	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
4	Først Medisinsk Laboratorium	-	+	+
5	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
6	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
7	Først Medisinsk Laboratorium	-	+	+
8	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
9	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
10	Først Medisinsk Laboratorium	-	+	+
11	Først Medisinsk Laboratorium	-	+	+
12	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
13	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
14	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
15	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
16	SSK	+	+	+
17	SSK	+	+	+
18	SSK	+	+	+
19	SSK	+	+	+
20	23 800 bakteriegenom/ μ l	+	+	-
21	2 380 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
22	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
23	23 800 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
24	2 380 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
25	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
Prøvenr.	Cervikalt sekret fra pasient med cervisitt			
1	Først Medisinsk Laboratorium	-	+	+
2	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
3	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
4	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
5	Først Medisinsk Laboratorium	+	+	+
6	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
7	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
8	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
9	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
10	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
11	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
12	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
13	24 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
14	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
15	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
16	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
17	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
18	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
19	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
20	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
21	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
22	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
23	23 800 bakteriegenom/ μ l	+	+	-
24	2 380 bakteriegenom/ μ l	+	+	+
25	238 bakteriegenom/ μ l	+	+	+

4.3.5 Presisjon

C_T -verdiene fra eksperimentene som er listet i Tabell 11 er brukt til å beregne intra- og inter-assay variasjonene. Intra-assay variasjonen er beregnet fra de fem replikatene som ble analysert i hvert oppsett. Intra-assay variasjonen for ikke biologisk materiale viste en variasjonskoeffesient som varierte fra 0,3 % til 0,8 % ved høy konsentrasjon, og 1,2 % til 2,0 % ved lav konsentrasjon. For cervikalt sekret varierte variasjonskoeffesienten fra 0,5 % til 3,0 % ved høy konsentrasjon, og 0,5 % til 1,5 % ved lav konsentrasjon. For urin varierte variasjonskoeffesienten fra 0,9 % til 3,4 % ved høy konsentrasjon, og 0,4 % til 2,4 % ved lav konsentrasjon. Inter-assay variasjonen er beregnet fra gjennomsnittsverdien til alle oppsettene.

Inter-assay-variasjonen for ikke biologisk materiale, cervikalt sekret og urin var på henholdsvis CV 1,5 %, CV 2,4 % og CV 1,8 % ved lav konsentrasjon, og CV 0,8 %, CV 3,7 % og CV 3,3 % ved høy konsentrasjon.

Tabell 11. Oversikt over resultater fra presisjonseksperimentet for *M. genitalium*. Tabellen viser gjennomsnittsverdien av *Cycle Threshold* til de fem replikatene for ikke biologisk og biologisk materiale. Eksperimentet er utført med høy og lav konsentrasjon over fem dager.

<i>M. genitalium</i> G37 ≈23 800 bakteriegenom/μl	Ikke biologisk materiale		Cervikalt sekret		Urin	
	(n=5)		(n=5)		(n=5)	
	Gjennomsnitt		Gjennomsnitt		Gjennomsnitt	
	C_T -verdi ± SD	CV %	C_T -verdi ± SD	CV %	C_T -verdi ± SD	CV %
Dag 1	25,59 ± 0,12	0,5	25,54 ± 0,12	0,5	25,50 ± 0,87	3,4
Dag 2	25,46 ± 0,09	0,3	25,85 ± 0,14	0,5	24,61 ± 0,47	1,9
Dag 3	25,67 ± 0,20	0,8	25,33 ± 0,39	1,6	25,15 ± 0,56	2,2
Dag 4	25,73 ± 0,20	0,8	23,46 ± 0,81	3,5	24,27 ± 0,80	3,3
Dag 5	25,21 ± 0,11	0,5	25,27 ± 0,26	1,0	26,38 ± 0,24	0,9
≈24 bakteriegenom /μl						
Dag 1	34,65 ± 0,67	1,9	33,95 ± 0,51	1,5	34,44 ± 0,84	2,4
Dag 2	33,82 ± 0,66	1,9	32,92 ± 0,43	1,3	32,95 ± 0,25	0,8
Dag 3	34,58 ± 0,49	1,4	33,08 ± 0,17	0,5	33,26 ± 0,23	0,7
Dag 4	34,66 ± 0,40	1,2	34,40 ± 0,48	1,4	33,90 ± 0,13	0,4
Dag 5	35,29 ± 0,72	2,0	34,77 ± 0,43	1,3	33,94 ± 0,26	0,8

C_T = Cycle Threshold

SD= Standard Deviation

CV= Coefficient of Variation

4.4 Validering

4.4.1 Robusthet ved volumendringer

Enveis ANOVA viser at både ulike volum av PCR-miksen og templat (positiv kontroll), ikke gir noen signifikant forskjell av C_T -verdiene for ikke biologisk materiale ($P > 0,05$).

Enveis ANOVA viser at både ulike volum av PCR-miksen og templat, gir en signifikant forskjell av C_T -verdiene for cervikalt materiale ($P < 0,05$). Utvidet Tukey test viser at det er en signifikant forskjell mellom 5 μ l og 3, μ l og mellom 5 μ l og 1 μ l av templatet ($P < 0,05$).

Det er også en signifikant forskjell mellom 15 μ l og 10 μ l PCR miks ($P < 0,05$). Enveis ANOVA viser at ulike volum av templatet, gir en signifikant forskjell av C_T -verdiene for urin ($P < 0,05$). Utvidet Tukey test viser at det ikke er en signifikant forskjell av C_T -verdiene for urin mellom 5 μ l templat og de tre andre volumene ($P > 0,05$). De ulike volumene av PCR-miksen gir ikke noen signifikant forskjell av C_T -verdiene for urin ($P > 0,05$).

Tabell 12. Oversikt over eksperimentene med ulike volum av PCR-miks og eluat.

<i>M. genitalium</i> G37 ≈24 bakteriegenom/μl		Gjennomsnitt C _T -verdi ± SD Volum PCR-miks			
Matriks	Volum pr. reaksjon	20 μl	15 μl	10 μl	5 μl
Ikke biologisk materiale (vann) (n=3)	1 μl		35,78 ± 0,95		
	3 μl		34,53 ± 1,02		
	5 μl	34,89 ± 1,41	33,95 ± 0,84	34,79 ± 0,70	33,36 ± 0,77
	10 μl		33,84 ± 0,30		
Cervikalt sekret (n=3)	1 μl		35,37 ± 0,23		
	3 μl		34,68 ± 0,47		
	5 μl	34,78 ± 0,14	33,43 ± 0,34	35,18 ± 0,81	33,76 ± 0,60
	10 μl		33,58 ± 0,13		
Urin (n=3)	1 μl		35,23 ± 0,37		
	3 μl		34,31 ± 0,68		
	5 μl	34,77 ± 0,77	33,77 ± 0,63	33,92 ± 0,32	33,66 ± 0,45
	10 μl		33,02 ± 0,85		

C_T = Cycle Threshold

SD= Standard Deviation

4.4.2 Effektivitet

Threshold Line er plassert manuelt i amplifikasjonskurvens lineære fase.

Et gjennomsnitt av C_T-verdien til de ulike fortyntingene er vist i Tabell 13.

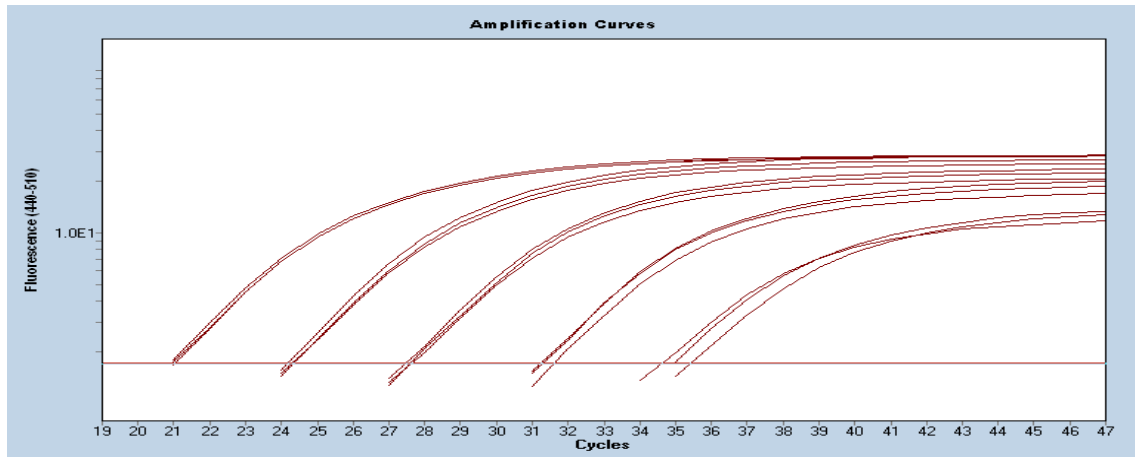
Programvaren til LightCycler 480 bruker C_T-verdiene til å beregne en standardkurve (beste rette linje). Standardkurvene er vist i Figur 5-Figur 12. Standardkurvenes stigningstall var innenfor grenseverdiene for både biologisk og ikke biologisk matriks. C_T-verdiene var lineære på en log lineær skala for 5 log intervaller av fortyntingsseriene med *M. genitalium*. Den kalkulererte effektiviteten til reaksjonen var nær 2,0. Effektiviteten til amplifikasjonen er noe forskjøvet for biologisk matriks sammenlignet med ikke biologisk. Det ble ikke påvist noen forskjell av bakgrunnsignalet (NTC) til de ulike matriksene.

Tabell 13. Effektivitetstest av *M. genitalium* G37 DNA på LightCycler 480.

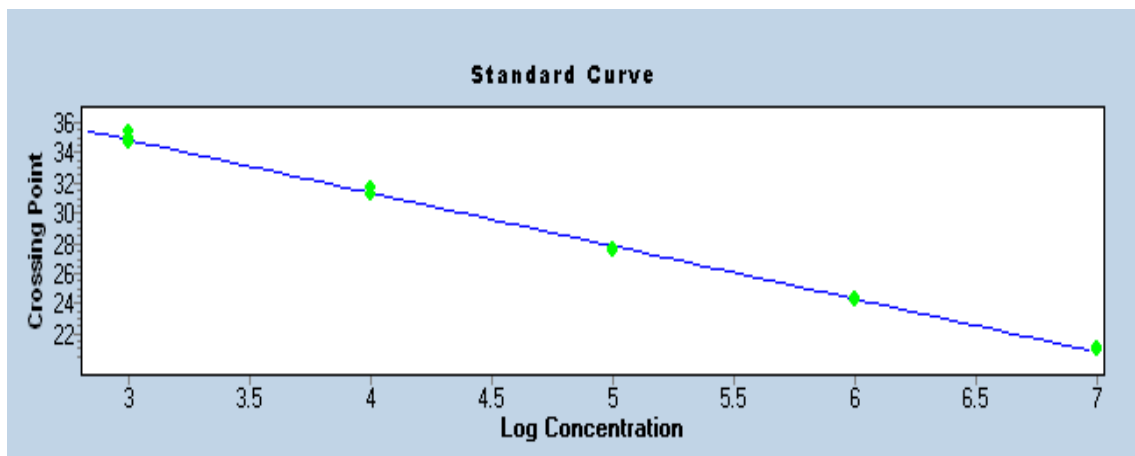
<i>M. genitalium</i> G37 Bakteriegenom/ μ l	Gjennomsnitt C _T -verdi \pm SD			
	Før optimalisering	Etter optimalisering		
	Ikke biologisk materiale (n=3)	Ikke biologisk materiale (n=3)	Urin (n=3)	Cervikalt sekret (n=3)
\approx 238 000	20,97 \pm 0,07	21,34 \pm 0,08	22,89 \pm 0,15	23,75 \pm 0,07
\approx 23 800	24,26 \pm 0,08	24,68 \pm 0,09	25,13 \pm 0,49	26,45 \pm 0,30
\approx 2 380	27,56 \pm 0,09	27,96 \pm 0,07	29,04 \pm 0,30	29,95 \pm 0,33
\approx 238	31,37 \pm 0,21	31,42 \pm 0,13	32,81 \pm 0,48	33,25 \pm 0,34
\approx 24	34,98 \pm 0,41	35,14 \pm 0,96	34,85 \pm 0,56	35,74 \pm 0,33
Kurvens stigningstall	-3,502	-3,318	-3,160	-3,153
Effektivitet	1,930 (93 %)	2,001 (100 %)	2,072 (107 %)	2,076 (108 %)

C_T = Cycle Threshold

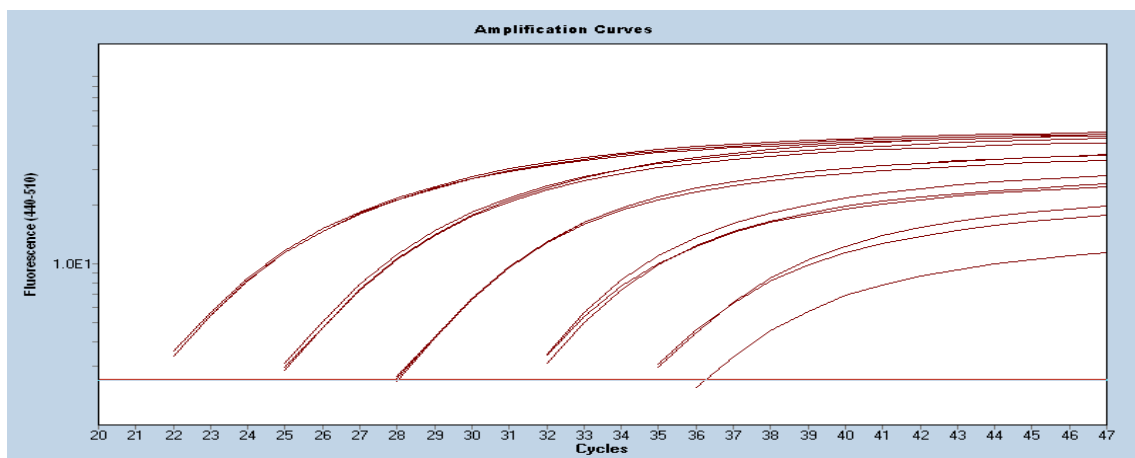
SD= Standard Deviation



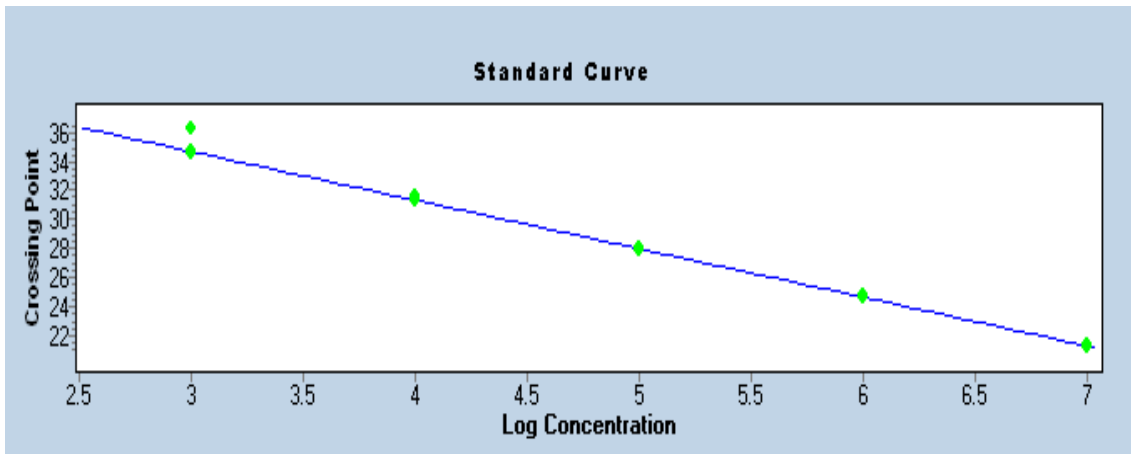
Figur 5. Fluoresenskurver til en 10-folds fortyningsserie av *M. genitalium* G37 DNA i ikke biologisk matriks før optimalisering på LightCycler 480. Konsentrasjon fra ca. 238 000 til ca. 24 bakterieen/μl.



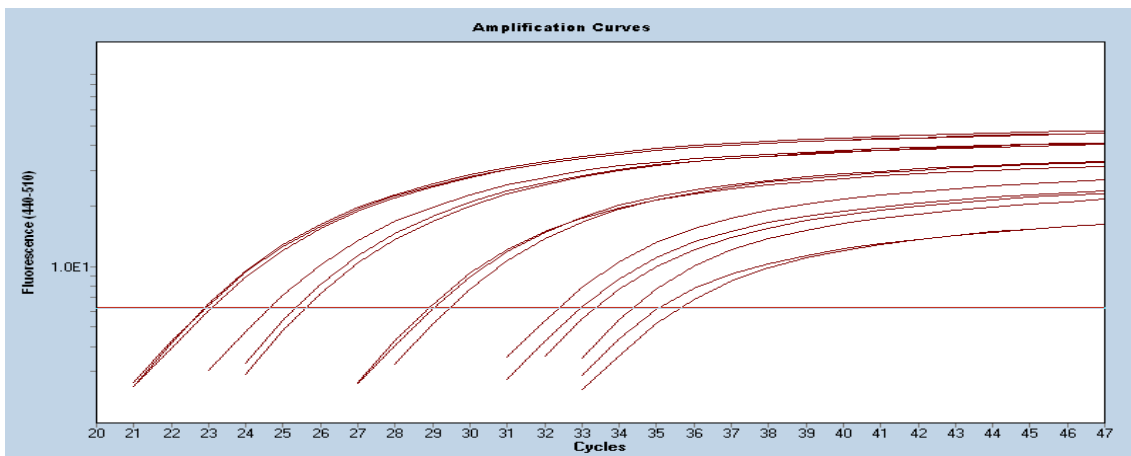
Figur 6. Standardkurve for ikke biologisk matriks før optimalisering. Gjennomsnittets C_T -verdi er plottet mot log konsentrasjonen til hver av de fem fortyningene av LightCycler Software.



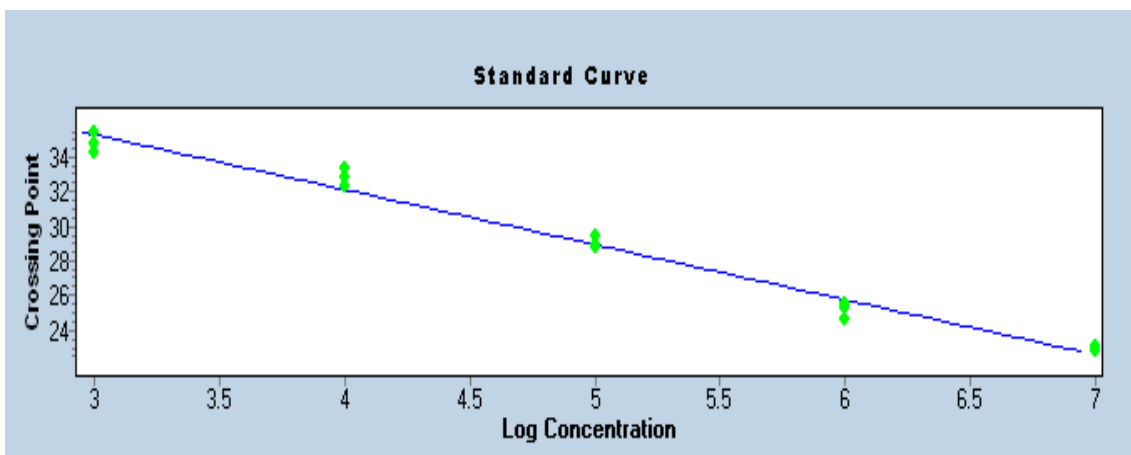
Figur 7. Fluoresenskurver til en 10-folds fortyningsserie av *M. genitalium* G37 DNA i ikke biologisk matriks etter optimalisering på LightCycler 480. Konsentrasjon fra ca. 238 000 til ca. 24 bakterieen/μl.



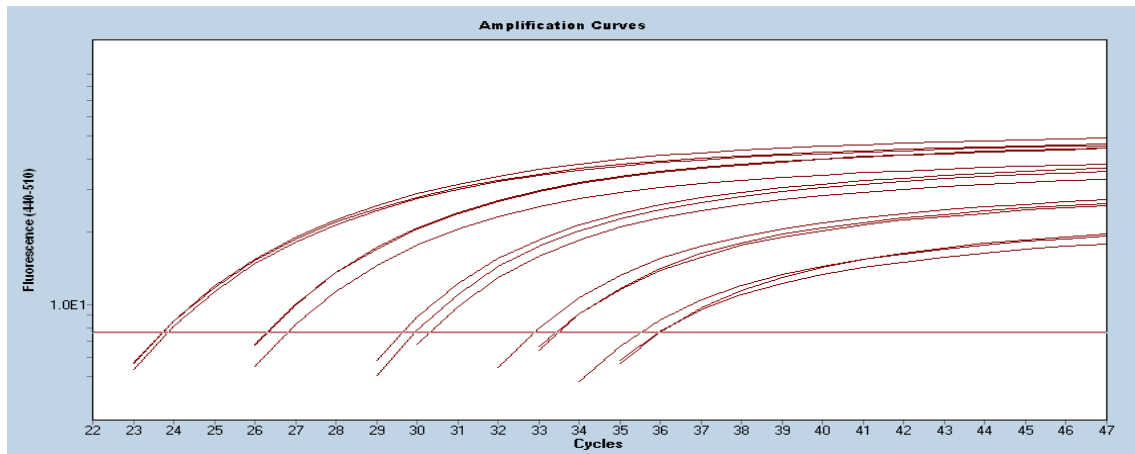
Figur 8. Standardkurve for ikke biologisk matriks etter optimalisering. Gjennomsnitts C_T -verdi er plottet mot log konsentrasjonen til hver av de fem fortynningene av LightCycler Software.



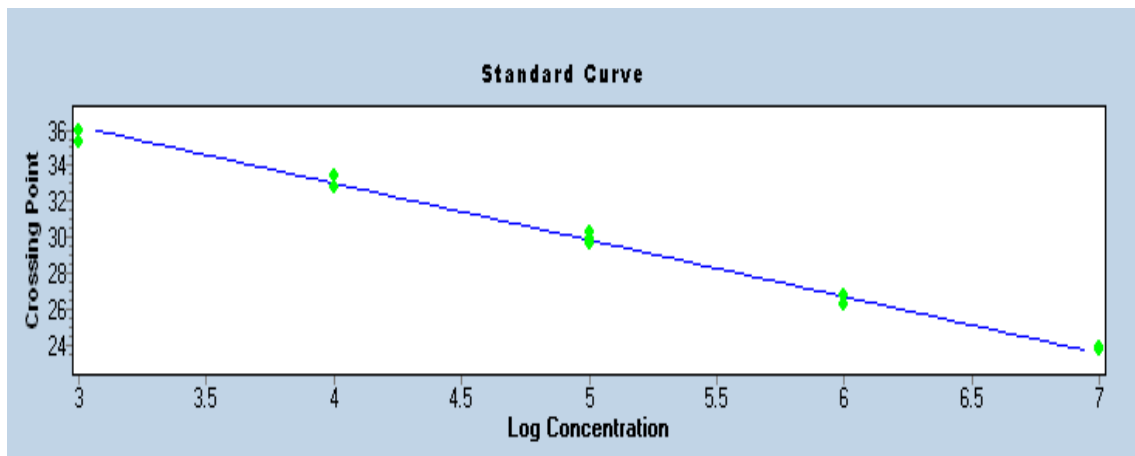
Figur 9. Fluoresenskurver til en 10-folds fortynningsserie av *M. genitalium* G37 DNA i urin på LightCycler 480. Konsentrasjon fra ca. 238 000 til ca. 24 bakteriegenom/ μ l.



Figur 10. Standardkurve for urin. Gjennomsnitts C_T -verdi er plottet mot log konsentrasjonen til hver av de fem fortynningene av LightCycler Software.



Figur 11. Fluoresenskurver til en 10-folds fortyningserie av *M. genitalium* G37 DNA i cervikalt sekret på LightCycler 480. Konsentrasjon fra ca. 238 000 til ca. 24 bakteriegenom/ μ l



Figur 12. Standardkurve for cervikalt sekret. Gjennomsnitts C_T -verdi er plottet mot log konsentrasjonen til hver av de fem fortyningene av LightCycler Software.

5 Diskusjon

5.1 Analytisk sensitivitet

I denne studien er det etablert en dupleks Real-time PCR analyse med TaqMan prober for diagnostikk av *M. genitalium* og en intern hemmerkontroll. Analysen er basert på en publikasjon til Svenstrup *et al.* [9] for påvisning av *gap* genet til bakterien. Primersekvensene i denne publikasjonen så ikke ut til å være optimale slik at nye sekvenser ble designet. Eksperimentet for primer-dimer dannelse viste en klar forbedring i forhold til de originale sekvensene noe som sannsynligvis indikerer en forbedret sensitivitet.

Analysen er sensitiv og spesifikk for både urin og endocervikale prøver, og kan utføres i løpet av 3-4 timer. Ulike fortyninger med 20 replikater viser at analysen har en meget bra deteksjonsgrense ned mot 1 bakteriegenom/reaksjon. Denne grensen kan imidlertid ikke brukes innen diagnostikk fordi andelen falske negative resultater er for stor i dette konsentrasjonsområdet. I både biologisk og ikke biologisk matriks ble kun 2-3 av 20 replikater positive (10-15 %) ved en konsentrasjon på 1 bakteriegenom/reaksjon. Dette indikerer 85-90 % sjans for et falskt negativ resultat. Årsaken til denne usikkerheten kan skyldes at analysen blir meget sårbar for små pipetteringsfeil i dette konsentrasjonsområde, kontrollmaterialet er ikke homogent eller fordamping av PCR-miksen i reaksjonsbrettet. Testens realistiske deteksjonsgrense må følge Poisson normalfordeling som angir den laveste bakterie konsentrasjonen der ≥ 95 % av replikatene er positive [83]. Den analytiske sensitiviteten (LOD_{95}), for både biologisk materiale og ikke biologisk materiale, er 35 bakteriegenom/reaksjon. Denne mengden med DNA bør være tilstrekkelig til å påvise bakterien hos pasienter med symptomer på uretritt eller cervicitt. Studier med kvantitative PCR-metoder har vist at pasienter med små mengder DNA fra *M. genitalium* ofte er asymptomatiske [19, 84]. Men testens gode sensitivitet er avhengig av korrekt prøvetaking, som første urinprøve, cellehøsting i cervix, oppbevaring, transport og ekstraksjon. Studien til Svenstrup *et al.* [9] viste en deteksjonsgrense på ≥ 5 bakteriegenom/reaksjon (*gap*), Jurstrand *et al.* [8] ≥ 5 bakteriegenom/reaksjon (*16S rRNA*), Yoshida *et al.* [19] 10 bakteriegenom/reaksjon (*16S rRNA*), Blaylock *et al.* [85] 10 bakteriegenom/reaksjon (*gyrA*) og Jensen *et al.* [7] < 5 bakteriegenom/reaksjon (*MgPa*). Alle disse forsøkene er utført med ikke biologisk materiale som fortynningsvæske (vann), og uten IC. Siden det ikke finnes noe kjent kvantitativt kontrollmateriale av *M. genitalium* på markedet, må konsentrasjonen angis med metoder som f.eks. optisk tetthetsmåling (NanoDrop). Slike målinger har ofte lav

presisjon (CV 11 %), og må i tillegg utføres for meget høye konsentrasjoner av kontrollmateriale. Fortynninger ned mot deteksjongrensen (3×10^{-7}) krever mange pipetteringsstrinn som kan gi noe avvik fra forventet konsentrasjon.

Eksperimentet viste at det biologiske materiale ikke påvirket den analytiske sensitiviteten. Det kan derfor se ut som fjerningen av PCR hemmende forbindelser nesten er komplett i urin og cervikalt sekret etter ekstraksjon av MagNA Pure LC, eller at prøvematerialene som ble brukt inneholdt små mengder inhiberende forbindelser. Men her vil det være biologisk variasjoner [86, 87]. Flere studier har imidlertid påvist PCR inhibitorer i urin og endocervikale prøver med andre ekstraksjonsmetoder [88-90].

5.2 Analytisk spesifisitet.

Analytisk spesifisitet er utført for å teste om primere/prober i PCR-metoden krysshybridiserer med annet DNA i prøvematerialet, eller fra beslektede organismer [91]. Et panel (Tabell 9) med mikrober, nært beslektet med *M. genitalium* eller fra den urogenitale flora, er brukt. Panelet besto av DNA fra mikrober fra en stammebank og agens fra ulike pasientprøver bekreftet med forskjellige PCR-metoder (SSHF). Ingen kryssreaksjoner ble påvist. I tillegg er det utført et BLAST søk i GenBank (01. desember 2008) som viste eksakte treff av primerne og proben til kun sekvensene på *gap* genet til *M. genitalium* (L43967). Genet er et husholdningsgen som kan ha homologe sekvenser hos andre arter, eller andre genotyper, enn dem som er oppgitt i GenBank. GenBank inneholder bare en liten del av alle nukleinsyresekvenser som finnes i naturen, og primer og probesekvensene må kontrolleres jevnlig mot nye publiserte sekvenser.

Deltagelse i et program fra et eksternt kvalitetsvurderingsorgan, som *Quality Control for Molecular Diagnostics* (QCMD- <http://www.qcmd.org>), kan være nyttig for å overvåke nye genotyper. QCMD tilbyr prøvepaneler for en rekke mikrobiologiske agens for å sammenlikne de deltakende laboratorienes prestasjoner, men dessverre står ikke påvisning av *M. genitalium* DNA på programmet foreløpig. Sammenliknende laboratorieprøving omtales også som ”ringtest” eller ”proficiency testing” og er en form for eksternt kvalitetskontroll. Et samarbeid med et annet laboratorium om utveksling av et panel med oppsamlede positive og negative pasientprøver, kan være en grei erstatning.

5.3 Nøyaktighet

For å undersøke nøyaktigheten til analysen må en referansemetode (gullstandard) være tilgjengelig. Dette er komplisert fordi *M. genitalium* er vanskelig å dyrke på agar og i cellekultur, og serologi byr på kryssreaksjoner med andre mykoplasma arter [12]. Alternativet er å sammenligne den nye PCR-analysen med en PCR-analyse med et annet målgen. Den egenutviklede analysen hadde en svært god diagnostisk sensitivitet, spesifisitet, prediktiv positiv og negativ verdi basert på undersøkelse av panelet med 50 positive (Tabell 10) og 50 negative pasientprøver. Den sammenlignende analysen hadde noe lavere nøyaktighet etter at fire av de positive pasientprøvene fra Først Medisinsk Laboratorium viste negativt resultat. Årsaken kan være at undersøkelsen er utført med standardbetingelser, og ikke optimalisert etter reagensene og instrumentet som er brukt i denne studien. En annen mulighet er at primerne og probene ikke er spesifikke til templatet. Svakheten med undersøkelsen er at antall positive pasientprøver er lite, men eksperimentet indikerer at den egenutviklede analysen er fullt på høyde med Real-time PCR analysen til Jurstrand *et al.*[8]. En blind studie av pasienter med klinisk mistanke om *M. genitalium* infeksjon kunne vært utført med de to metodene, men med den lave prevalensen som er påvist i Norge (4.5 %) vil dette vært svært ressurskrevende. Det er ikke stilt noe krav om en slik undersøkelse i IVD-direktivet.

De simulerte pasientprøvene har ulik konsentrasjon av *M. genitalium*, men avslører ikke ulike karaktertrekk som genetisk variasjon innen målgenet. De to metodene er basert på det samme prinsippet, og vil ikke avdekke forskjeller for viktige faktorer innen diagnostisk sensitivitet som prøvetaking, oppbevaring, transport og ekstraksjon [63].

5.4 Presisjon

Presisjonsmålingene viste meget god repeterbarhet og intermediær presisjon for både biologisk og ikke biologisk materiale ved høye og lave konsentrasjoner av målgenet. Intra-assay variasjonen samlet, for alle materialene, varierte fra CV 0,5 % til CV 3,5 % ved høy konsentrasjon, og CV 0,4 % til CV 2,4 % ved lav konsentrasjon. Inter-assay variasjonen varierte fra CV 0,8 % til CV 3,7 % ved høy konsentrasjon, og CV 1,5 % til CV 2,4 % ved lav konsentrasjon. For å oppnå god repeterbarhet og intermediær presisjon, er det viktig at reagensene, instrumentene og analytikernes arbeidsrutiner er stabile. Det mest kritiske reagens er enzymet DNA polymerase. Alle *Taq* DNA polymeraser viser en liten målbar aktivitet ved romtemperatur. Dette kan føre til primer-dimer dannelse og uspesifikke reaksjoner ved romtemperatur. I verste fall kan det miste aktiviteten ved for mange fryse-tine operasjoner.

Hot Start DNA polymeraser viser ingen aktivitet ved romtemperatur og gir derfor et renere amplifikasjonsprodukt. *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe* er kjemisk modifisert med molekyler bundet til aktivt sete som ødelegges ved oppvarming ved 95 °C i 10 minutter [92]. Oppsettene i eksperimentet for presisjon er utført av en analytiker. Forskjeller i arbeidsrutiner mellom analytikere, som f. eks pipettering, kan gi utslag i presisjonen. Nye analytikere bør gjøre et presisjonseksperiment med tilfredsstillende resultat som et ledd i opplæringen av metoden. LightCycler 480 er vedlikeholdsfritt og kontrollerer deteksjonsenheten og temperaturen i termocycleren ved oppstart av hver analyse.

5.5 Måleområde

Angivelse av måleområde gjelder vanligvis ikke for kvalitative analyser [63]. Ved å definere LOD_{95} er det satt en terskel for hva som er innenfor repeterbart område. Positive resultater med en C_T -verdi høyere enn LOD_{95} må repeteres, og resultatet av den siste amplifikasjonen blir tellende. CT -verdier på 40 eller høyere betyr ingen amplifikasjon og resultatet kan ikke vektlegges [70].

5.6 Valg av intern hemmerkontroll

I denne studien er det valgt en eksogen, ikke konkurrerende IC, der både målgenet og IC amplifiseres i samme reaksjonsbrønn. Denne konstruksjonen er praktisk, og har økonomiske fordeler p.g.a. redusert reagensforbruk, selv om amplifikasjonen av IC ikke fullt ut reflekterer amplifikasjonen av målgenet [57]. Konkurransen om primerne vil ikke forekomme, men det vil være en konkurranse om andre amplifikasjonsreagenser, som DNA polymerase, dNTP og Mg^{2+} -ioner som kan minske den analytiske sensitiviteten [93]. Alternativet vil da være å amplifisere målgenet og IC i hver sin reaksjonsbrønn (monopleks PCR). Konsentrasjonen av IC er konstant og bør være så lav at konkurransen ikke påvirker sensitiviteten til målgenet, samtidig som små mengder hemmere av amplifikasjonen kan avsløres. Eksperimentet for analytisk sensitivitet viste at konsentrasjonen til *MS2* DNA er så lav (250 kopier/reaksjon) at den ikke vil påvirke *gap*-genets analytiske sensitivitet. Ved påvisning av hemmere i prøven repeteres analysen ufortynnet og i 1:10 fortykning [83].

DNA fra bakteriofagen Lambda ble først prøvd som IC. To primere, en probe merket med fluoroforen, Texas Red, og templat (*phage* Lambda DNA) ble produsert og levert av Tib-

Molbiol. Lambda DNA brukes som IC til spinal- og luftveisprøver av SSHF. Kontrollen ble tilsatt hver prøve før ekstraksjon i en konsentrasjon som ville gi maksimalt 1000 kopier/reaksjon (C_T -verdi på ca. 30) ved fullt utbytte. Ved analyse av urinprøvene oppsto et problem som ikke var forutsett. Enkelte av resultatene for Lambda DNA viste en konsentrasjon som var mer enn 1000 ganger høyere enn det forventede resultatet (C_T -verdi på ca. 20). Lambda DNA utvinnes fra en *E.coli* stamme og BLAST søk viste eksakte treff for både primere og probe på sekvenser hos enkelte *E.coli* stammer. Sannsynligvis inneholdt noen av urinprøvene store mengder *E.coli* som førte til krysshybridisering. IC kan i disse tilfellene utkonkurrere amplifikasjonen av *gap*-genet, og dermed øke risikoen for et falskt negativt resultat.

5.7 IVD-godkjenning

Real-time PCR analysen for påvisning av *M. genitalium* DNA er godkjent etter Europaparlaments- og rådsdirektiv 98/79/EF om medisinsk utstyr til *in vitro*-diagnostikk og kan derfor også brukes innen rutinediagnostikk av urin- og endocervikaleprøver fra primærhelsetjenesten. Etter at IVD-direktivet endelig trådte i kraft 1. april 2006 er det ikke lenger tilstrekkelig å tilby diagnostikk med egenutviklede Real-time PCR metoder til primærhelsetjenesten uten å kunne legge fram dokumentasjon på verifisering og validering. Egenutviklede nukleinsyrebaserete metoder er utbredt på medisinske mikrobiologiske laboratorier i Norge, men hittil har få IVD-godkjent disse. Årsaken kan skyldes uklare eller manglende retningslinjer fra myndighetene eller frykt for merarbeid med høye kostnader. Helsedirektoratet har pr. 01. desember 2008 ikke klart å etablere et teknisk kontrollorgan for påvisningsmetoder av agens på Liste A og B. For enkelte agens finnes kommersielle kit som oppfyller kravene i IVD-direktivet (CE merket). Resultater fra sammenliknende laboratorieprøving viser at kitene ikke nødvendigvis er bedre enn egenutviklede tester og er dessuten kostbare. For de agens som ikke står på Liste A eller B, gjelder grunnleggende krav, og produsenten må selv finne ut hvor akseptabelt nivå ligger. Nukleinsyrebaserete analysemetoder har utviklet seg så hurtig de siste årene at retningslinjer har vært vanskelig å anbefale [57]. Utfordringen for laboratoriene har vært å vite hvilke verifiseringeksperimenter som bør gjøres, hvor mange og for hvilke prøvematerialer.

5.8 Hva skal CE-merkes?

I denne studien blandes enzymene (DNA polymerase og UNG), magnesium og en primermiks-løsning til en PCR-miks, før ekstrahert prøvemateriale og kontroller tilsettes. Det er sammensetningen av reagenser i PCR-miksen som betraktes for å være egenprodusert IVD utstyr, og skal CE-merkes før det tas i bruk. PCR-miksen for *M. genitalium* er verifisert og validert for urin og cervikalt sekret i LightCycler 480-instrumentet. Det er ingen salgsemballasje, som følge av at utstyret ikke fysisk er plassert på markedet. Som IVD-direktivet (§ 3-4) tilsier, kan det da ses bort i fra kravet til CE-merking av emballasje. Videre vil PCR-miksen være av en slik art at det ikke vil være hensiktsmessig å CE-merke, fordi det ikke kan påføres PCR-miksen, da den må lages like før bruk. En nedfrosset PCR-miks klar til bruk ville vært å foretrekke, men det vil medføre at miksen må fryses etter bruk, for å bevare aktiviteten til DNA polymerase. Produsenten garanterer ikke for aktiviteten til DNA polymerase når det er tint mer enn én gang. Stabiliteten for en slik miks vil sannsynligvis være redusert.

De enkelte reagensene i PCR-miksen, bortsett fra primermiksen, er klare til bruk, men ikke CE-merket av produsenten (*research* produkt). Leverandørene anses for å være ansvarlig for produktet inntil de kombineres med andre produkter. Etter dette overføres ansvaret til produsenten av PCR-miksen. Primermiksen er den eneste av ingrediensene i PCR-miksen som er egenprodusert, og skal derfor påføres CE-merket. Den består av primere og prober for *M. genitalium* og IC, blandet i nukleasefritt vann. Primerne og probene kjøpes i frysetørret tilstand og må løses i nukleasefritt vann til en bestemt konsentrasjon, før de blandes sammen til en primermiks. Miksen oppbevares i kjøleskap (2-8 °C) og er stabil i minst 6 måneder.

I vurderingen av hva som skal IVD-godkjennes er det brukt CE-merkede kommersielle Real-time PCR kit som modell. CE-merkingen til kommersielle kit gjelder bare for reagensene i kitet. Det kan kun benyttes de reagensene, kontrollene, reaksjonsplatene, forsegling og Real-time instrument som er beskrevet i brukerveiledningen (Se Brukerveiledning og samsvarsvurdering på side 67). Reagensene må tilsettes i oppgitt (optimalisert) mengde, og PCR programmet i veiledningen må følges. Oppsettet må utføres av et trent personell i et PCR laboratorium med et godt kvalitetssystem. Kvaliteten på prøvene inngår ikke i denne delen av CE-merkingen. Det er ikke stilt krav til prøvetakingsutstyr/medium eller ekstraksjonsmetode, men veiledningen oppgir hva slags prøvemateriale som kan benyttes. En reverifisering må utføres hvis det gjøres vesentlige endringer i metoden som f.eks. skifte av enzymleverandør, innføring av en ny type prøvemateriale eller ved bruk av andre Real-

time PCR instrumenter. Ved mindre endringer, som f.eks. bytte av reaksjonsbrett, må omfanget av reverifisering vurderes.

5.9 Risikovurdering:

Det er vanskelig å gi en objektiv kartlegging av risiko ved bruken av en Real-time PCR metode. En risikovurdering kan ikke gi et sikkert svar på om noe i, eller ved metoden, er helseskadelig eller ikke. Risikovurderingen vil derimot kunne identifisere så mange som mulig av de potensielle farene knyttet til analysen. Den må være detaljert i identifikasjon av farer og angi sannsynligheten for at de skal kunne oppstå, samt konsekvensene av dem. Under utarbeidelsen av IVD-direktivet er det gjort en risikovurdering over agens som kan utgjøre en risiko for pasienter i tilfelle svikt av metoden [60]. *M. genitalium* står ikke oppført på listen (A eller B) over infeksjøs agens som representerer en slik risiko. Bakterien er assosiert med uretritt og cervisitt og vil neppe påføre pasienten alvorlige lidelser ved en overflødig antibiotikakur eller en ubehandlet infeksjon. Bruken av produktet (egenutviklede analysen) reduserer sannsynligvis risikoen for helseskade hos pasienten. Om pågående studier viser at *M. genitalium* kan knyttes til infertilitet er det sannsynlig at bakterien flyttes opp til Liste B som *C. trachomatis*, og en mer omfattende risikoanalyse må utføres [12]. For å unngå at falske positive eller negative resultater forekommer er det viktig med et godt trent personell, stabile reagenser og utstyr, og en grundig overvåking av prosessen. Hendelser som kan føre til at analysen ikke kan utføres, kan inntreffe. Årsaken kan være kontaminasjon, dårlig reagenskvalitet, mangel på reagenser, feil på utstyr, forsinkelse av leveranse eller produksjonsproblemer hos leverandør. Tiltak bør derfor være klar på forhånd. Et tiltaket kan være å sende prøvene til et annet laboratorium for å forhindre forsinkelse av resultatene.

Sikkerhetsdatabladene oppgir at reagensene i PCR-miksen ikke inneholder noen kjente farlige forbindelser som kan utgjøre fare for laboratoriepersonellet. Vanlig forhåndsregler for kjemikalier må følges.

5.10 Validering:

Kvaliteten til reagensene, instrumentene, analytikers arbeidsrutiner og pipetteringsegenskaper, kan bidra til å påvirke amplifikasjonen. En valideringsrapport er skrevet som dokumentasjon for at PCR-miksen er stabil og gir en god ytelse (Se Valideringsrapport på side 73)

Amplifikasjonen overvåkes ved å notere C_T -verdien til en DNA positiv *M. genitalium* kontroll (lav konsentrasjon) i et Levey-Jennings diagram [94]. Resultatene antas å følge Gauss kurve og evalueres etter Westgaards regler [95]. Sparingstiltak, med eventuell ny produksjon av primermiks og kontroller, må utføres dersom Westgaards regler ikke oppfylles. Kontrollen har en holdbarhet på 6 måneder og oppbevares <-18 °C, men bør porsjoneres for å unngå en svekkelse ved tine-fryse prosessen. Når en ny lot. av primermiksen, eller positiv kontroll tas i bruk, må den sammenlignes med den gamle. Denne prosesskontrollen overvåker ikke bare kvaliteten til den CE-merkede PCR-miksen, men også enzymene, magnesiumkonsentrasjonen, pipetteringen til operatøren, oppvarming, avkjøling og avlesningsenheten i *LightCycler 480*. Lot. nummer til alle reagensene som brukes i PCR miksen føres i et skjema for å sikre full sporbarhet. Reagensene til ekstraksjonen er fra et kommersielt kit og klare til bruk. Prosessen blir overvåket ved en ekstraksjonskontroll (positiv kontroll) som er med i hvert ekstraksjonsoppsett. Kontrollen overvåkes på samme måte som prosesskontrollen for amplifikasjon (Westgaards regler) for godkjennelse av oppsettet. Kontrollen trenger ikke være DNA fra *M. genitalium*. Prosesskontrollene for amplifikasjonen og ekstraksjonen kan slås sammen til en kontroll, men i et laboratorium med stort prøvolum er to prosesskontroller å foretrekke. IC (*MS2* DNA) tilsettes prøven før ekstraksjon og kan også fungere som en prosesskontroll. Ulempen er at dette er nakent DNA som ikke gir noe informasjon om kvaliteten til luseringsprosessen.

5.11 Robusthet ved volumendringer

Enveis ANOVA viser at analysen er robust mot volumforandringer av både PCR-miksen og templat. Testen viser en signifikant forskjell av C_T -verdien ($P < 0,05$) mellom noen av de laveste volumene for cervikalt sekret og urin. Forskjellene i C_T – verdiene var imidlertid på kun to sykler for prøvene med lav konsentrasjon av templat og enveis ANOVA kan ha vært en for sensitiv test for dette eksperimentet. Forskjellen mellom C_T – verdiene kan skyldes tilfeldigheter, på grunn av få replikater, eller unøyaktig pipettering av analytiker. En annen årsak kan være at sluttkonsentrasjonen av templat og PCR-reagenser varierer noe i de forskjellige reaksjonene, på grunn av ulikt totalvolum.

5.12 Effektivitet

En rekke variabler kan påvirke effektiviteten til en PCR-reaksjon, for eksempel lengden på amplikon, uspesifikke produkter, sekundær strukturer, primerkvalitet, pipettering og lite optimale reaksjonsbetingelser [96]. Etter at primere og probe ble valgt, ble det utført grundige optimaliseringseksperimenter for å øke effektiviteten til amplifikasjon. Effektiviteten til biologisk materiale på > 100 % kan indikere små pipetteringsfeil ved tillaging av fortynningsrekkene, koamplifikasjon eller uspesifikke produkter. Det mest sannsynlige er likevel innhold av inhibitorer som kan hemme PCR-reaksjonen, spesielt i fortyningene med lav konsentrasjon. Effektiviteten av amplifikasjonen til biologisk matriser er innenfor akseptabelt nivå og indikerer god reproducerbarhet og robusthet. Resultatene samsvarer med undersøkelsene til Svenstrup *et al.* [9, 97] som viste en effektivitet av amplifikasjonen i ikke biologisk materiale på 100 %. Det ble observert en liten reduksjon av fluorescensintensiteten i alle eksperimentene med urinprøver. Forbindelser i urinen ser ut til å ha egenskaper som hemmer sterke fluorescenssignaler for fluoroforen (FAM) som detekterer *gap*-genet, men ikke fluoroforen (Texas Red) som detekterer IC. Dette kan skyldes egenfargen på prøvematerialet som påvirker deteksjonen. Fenomenet blir ofte omtalt som interferens, og har bare en kosmetisk betydning som ikke ser ut til å påvirke resultatene.

5.13 Kontaminasjon:

Selv om Real-time PCR testen er et lukket system er det nødvendig å fysisk skille de ulike prosessene i analysen for å forhindre kontaminasjon. Tre forskjellige arbeidsrom er valgt. Et rom til prøvepreparering og ekstraksjon, et rom med kabinett (DNA fritt) for tilblending av PCR-miks, en arbeidsbenk for tilsetning av eluat til PCR-miks og et rom til amplifisering (LightCycler 480). UNG er tilsatt reaksjonen for å forhindre reamplifikasjon av PCR produkter fra tidligere kjøring ved å fjerne uracil inkorporert i amplikon. Derfor brukes deoksyuracil trifosfat (dUTP) i stedet for deoksytymin trifosfat (dTTP) i PCR-miksen. UNG fungerer ikke over 55 °C [98]. Nye arbeidshansker og smittefrakker tilhørende hver arbeidsstasjon skal brukes og skiftes ved mistanke om kontaminasjon. Aerosol resistente filterspisser benyttes ved alt PCR arbeid. Arbeidsbenker, pipetter og annet utstyr rengjøres med 5 % klorløsning eller tilsvarende kommersielle kjemikalier. MagNA Pure LC og LightCycler 480 rengjøres etter produsentens anbefalinger.

5.14 Dokumentasjon

Til den egenutviklede analysen er det skrevet en brukerveiledning og samsvarsvurdering som alltid skal være tilgjengelig for analytiker (Se Brukerveiledning og samsvarsvurdering på side 67). Det er også utarbeidet en valideringsrapport på bakgrunn av valideringseksperimentene til analysen.

En samsvarserklæring er utfylt for den egenutviklede Real-time PCR analysen av *Mycoplasma genitalium* (Se Samsvarserklæring på side 75). SSHF bekrefter dermed at analysen oppfyller IVD-direktivets grunnleggende krav, og CE-merking kan påføres. Et obligatorisk abonnement av *Global Medical Device Nomenclature* (GMDN) ble etablert for å kunne registrere medisinsk utstyr i Utstysregisteret til Helsedirektoratet. Analysen er tildelt følgende kode i Utstysregisteret: NO9839975240-193

6 Konklusjon

I denne studien er det utviklet en kvalitativ Real-time PCR analyse for påvisning av *M. genitalium* DNA, med intern hemmerkontroll, fra urin- og endocervikale prøver. Analysen er verifisert og validert på en så grundig måte at vi (Enhet for mikrobiologi SSHF) mener den oppfyller kravene til IVD-godkjenning og kan påføres CE-merket og benyttes til diagnostikk. Siden det ikke finnes noen ”fasit”, eller spesifikk prosedyre for IVD-godkjenning av egenutviklede Real-time PCR analyser, er denne evalueringsprosessen kun et forslag over hvordan det kan gjøres.

M. genitalium er en forholdsvis nyoppdaget bakterie (1980) der mye av sammenhengen med klinikk, bortsett fra uretritt og cervisitt, ikke er kartlagt. Det er derfor viktig at Real-time PCR positive prøver må vurderes sammen med de kliniske symptomene til pasienten. Sensitiviteten til analysen er så høy at nukleinsyre fra bakterien kan påvises i epitel lenge etter adekvat antibiotikabehandling, og dersom det er ønskelig med kontroll etter behandling, må ny prøve tidligst tas etter en måned [99].

7 Litteratur

1. Kassler, W.J. and W. Cates, Jr., *The epidemiology and prevention of sexually transmitted diseases*. Urol Clin North Am, 1992. 19(1): p. 1-12.
2. Tully, J.G., et al., *A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract*. Lancet, 1981. 1(8233): p. 1288-91.
3. Folkehelseinstituttet, *Mykoplasmainfeksjon – genital, Smittevernhandboka*. 2007.
4. Folkehelseinstituttet, *MSIS-Statistikk*. 2007.
5. Maltau, J.M. and H. Moi, *Seksuelt overførbare infeksjoner og genitale hudsykdommer*. 2008: Gyldendal forlag. 256 sider.
6. Jensen, J.S., M.B. Borre, and B. Dohn, *Detection of Mycoplasma genitalium by PCR amplification of the 16S rRNA gene*. J Clin Microbiol, 2003. 41(1): p. 261-6.
7. Jensen, J.S., et al., *Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of Mycoplasma genitalium DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic*. J Clin Microbiol, 2004. 42(2): p. 683-92.
8. Jurstrand, M., et al., *Detection of Mycoplasma genitalium in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay*. J Med Microbiol, 2005. 54(Pt 1): p. 23-9.
9. Svenstrup, H.F., et al., *Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of Mycoplasma genitalium*. J Clin Microbiol, 2005. 43(7): p. 3121-8.
10. Dupin, N., et al., *Detection and quantification of Mycoplasma genitalium in male patients with urethritis*. Clin Infect Dis, 2003. 37(4): p. 602-5.
11. IVD-regelverk, *Rundskriv. Saksnummer: 03/5398*. Helsedirektoratet, Norge, IS-15/2003.
12. Jensen, J.S., *Mycoplasma genitalium infections. Diagnosis, clinical aspects, and pathogenesis*. Dan Med Bull, 2006. 53(1): p. 1-27.
13. Fraser, C.M., et al., *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium*. Science, 1995. 270(5235): p. 397-403.
14. Razin, S. and R. Herrmann, *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, ed. illustrated. 2002: Springer. 572 sider.
15. Razin, S., *The minimal cellular genome of mycoplasma*. Indian J Biochem Biophys, 1997. 34(1-2): p. 124-30.

16. Woese, C.R., J. Maniloff, and L.B. Zablen, *Phylogenetic analysis of the mycoplasmas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(1): p. 494-8.
17. Rogers, M.J., et al., *Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5S rRNA sequence data*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(4): p. 1160-4.
18. Herrmann, R. and B. Reiner, *Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium: a comparison of two closely related bacterial species*. Curr Opin Microbiol, 1998. 1(5): p. 572-9.
19. Yoshida, T., et al., *Quantitative detection of Mycoplasma genitalium from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR*. J Clin Microbiol, 2002. 40(4): p. 1451-5.
20. Glass, J.I., et al., *Essential genes of a minimal bacterium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(2): p. 425-30.
21. Gibson, D.G., et al., *Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a Mycoplasma genitalium genome*. Science, 2008. 319(5867): p. 1215-20.
22. Pollack, J.D., M.V. Williams, and R.N. McElhane, *The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells*. Crit Rev Microbiol, 1997. 23(4): p. 269-354.
23. Razin, S. and E. Jacobs, *Mycoplasma adhesion*. J Gen Microbiol, 1992. 138(3): p. 407-22.
24. Jensen, J.S., J. Blom, and K. Lind, *Intracellular location of Mycoplasma genitalium in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy*. Int J Exp Pathol, 1994. 75(2): p. 91-8.
25. Baczynska, A., et al., *Morphology of human Fallopian tubes after infection with Mycoplasma genitalium and Mycoplasma hominis--in vitro organ culture study*. Hum Reprod, 2007. 22(4): p. 968-79.
26. Peterson, S.N., et al., *Characterization of repetitive DNA in the Mycoplasma genitalium genome: possible role in the generation of antigenic variation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(25): p. 11829-33.
27. Iverson-Cabral, S.L., et al., *Intrastrain heterogeneity of the mgpB gene in Mycoplasma genitalium is extensive in vitro and in vivo and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences*. Infect Immun, 2006. 74(7): p. 3715-26.

28. Stein, M.A. and J.B. Baseman., *The evolving saga of Mycoplasma genitalium*. Clin. Micro. Newsletter, 2006, 28:41-48: p.
29. Zhang, S., D.J. Wear, and S. Lo, *Mycoplasma infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000. 27(1): p. 43-50.
30. Taylor-Robinson, D., *The role of mycoplasmas in non-gonococcal urethritis: a review*. Yale J Biol Med, 1983. 56(5-6): p. 537-43.
31. Jensen, J.S., et al., *Mycoplasma genitalium: a cause of male urethritis?* Genitourin Med, 1993. 69(4): p. 265-9.
32. Gambini, D., et al., *Mycoplasma genitalium in males with nongonococcal urethritis: prevalence and clinical efficacy of eradication*. Sex Transm Dis, 2000. 27(4): p. 226-9.
33. Mena, L., et al., *Mycoplasma genitalium infections in asymptomatic men and men with urethritis attending a sexually transmitted diseases clinic in New Orleans*. Clin Infect Dis, 2002. 35(10): p. 1167-73.
34. Jensen, J.S., *Mycoplasma genitalium: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2004. 18(1): p. 1-11.
35. Taylor-Robinson, D., *Mycoplasma genitalium -- an up-date*. Int J STD AIDS, 2002. 13(3): p. 145-51.
36. Leung, A., et al., *Mycoplasma genitalium is associated with symptomatic urethritis*. Int J STD AIDS, 2006. 17(5): p. 285-8.
37. Eickhoff, J.H., et al., *A double-blind, randomized, controlled multicentre study to compare the efficacy of ciprofloxacin with pivampicillin as oral therapy for epididymitis in men over 40 years of age*. BJU Int, 1999. 84(7): p. 827-34.
38. Krieger, J.N., et al., *Prokaryotic DNA sequences in patients with chronic idiopathic prostatitis*. J Clin Microbiol, 1996. 34(12): p. 3120-8.
39. Statens_Serum_Institut. *Mycoplasma genitalium PCR*. Available from: <http://www.ssi.dk/sw889.asp?pnr=1511>.
40. Tully, J.G. and J.B. Baseman, *Mycoplasma*. Lancet, 1991. 337(8752): p. 1296.
41. Tully, J.G., et al., *Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium mixture in synovial fluid isolate*. J Clin Microbiol, 1995. 33(7): p. 1851-5.
42. Baseman, J.B., et al., *Isolation and characterization of Mycoplasma genitalium strains from the human respiratory tract*. J Clin Microbiol, 1988. 26(11): p. 2266-9.

43. de Barbeyrac, B., et al., *Detection of Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium in clinical samples by polymerase chain reaction*. Clin Infect Dis, 1993. 17 Suppl 1: p. S83-9.
44. Jensen, J.S., H.T. Hansen, and K. Lind, *Isolation of Mycoplasma genitalium strains from the male urethra*. J Clin Microbiol, 1996. 34(2): p. 286-91.
45. Baseman, J.B., et al., *Diagnostic assessment of Mycoplasma genitalium in culture-positive women*. J Clin Microbiol, 2004. 42(1): p. 203-11.
46. Lind, K., *Serological cross-reactions between "Mycoplasma genitalium" and M. pneumoniae*. Lancet, 1982. 2(8308): p. 1158-9.
47. Jensen, J.S., et al., *Polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma genitalium in clinical samples*. J Clin Microbiol, 1991. 29(1): p. 46-50.
48. Falk, L., H. Fredlund, and J.S. Jensen, *Tetracycline treatment does not eradicate Mycoplasma genitalium*. Sex Transm Infect, 2003. 79(4): p. 318-9.
49. Wikstrom, A. and J.S. Jensen, *Mycoplasma genitalium: a common cause of persistent urethritis among men treated with doxycycline*. Sex Transm Infect, 2006. 82(4): p. 276-9.
50. Bjornelius, E., et al., *Antibiotic treatment of symptomatic Mycoplasma genitalium infection in Scandinavia: a controlled clinical trial*. Sex Transm Infect, 2008. 84(1): p. 72-6.
51. Norsk-Legemiddelhåndbok, *L1.2.8 Makrolider*. 2008.
52. Manhart, L.E., M.R. Golden, and J.M. Marrasso, *Expanding the spectrum of pathogens in urethritis: implications for presumptive therapy?* Clin Infect Dis, 2007. 45(7): p. 872-4.
53. Hamasuna, R., Y. Osada, and J.S. Jensen, *Antibiotic susceptibility testing of Mycoplasma genitalium by TaqMan 5' nuclease real-time PCR*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(12): p. 4993-8.
54. Jernberg, E., A. Moghaddam, and H. Moi, *Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of Mycoplasma genitalium infection: an open study*. Int J STD AIDS, 2008. 19(10): p. 676-9.
55. Bebear, C.M., et al., *Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas Ureaplasma spp., Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium and Chlamydia trachomatis*. Clin Microbiol Infect, 2008. 14(8): p. 801-5.

56. De Sarro, A. and G. De Sarro, *Adverse reactions to fluoroquinolones. an overview on mechanistic aspects*. *Curr Med Chem*, 2001. 8(4): p. 371-84.
57. Espy, M.J., et al., *Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing*. *Clin Microbiol Rev*, 2006. 19(1): p. 165-256.
58. IVD-regelverk, *CE-merking av medisinsk utstyr, Rundskriv. Saksnummer: 03/3409*. Helsedirektoratet, Norge, IS-11/2003.
59. Utstysregistrering, *Sosial- og helsedirektoratet og Direktoratet for samfunnssikkerhet og beredskaps retningslinje for registrering etter § 2-8 i forskrift om medisinsk utstyr*. http://www.helsedirektoratet.no/medisinskutstyr/utstysregistrering/registerer_meg/.
60. FOR-2005-12-15-1690, *Forskrift om medisinsk utstyr. Kapittel 3. In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr* <http://www.lovdatab.no/for/sf/jd/td-20051215-1690-010.html>.
61. Bartlett, J.M. and D. Stirling, *A short history of the polymerase chain reaction*. *Methods Mol Biol*, 2003. 226: p. 3-6.
62. Pierce, K.E. and L.J. Wangh, *Effectiveness and limitations of uracil-DNA glycosylases in sensitive real-time PCR assays*. *Biotechniques*, 2004. 36(1): p. 44-6, 48.
63. Sloan, L.M., *RealTime PCR in Clinical Microbiology: Verification, Validation and Contamination Control*. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2007. 29(12): p. 87-95.
64. Mackay, J., *Introduction to kinetic (real-time) PCR*. *Methods Mol Biol*, 2007. 353: p. 167-76.
65. Uhl, J.R., et al., *Use of the Roche LightCycler Strep B assay for detection of group B Streptococcus from vaginal and rectal swabs*. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(8): p. 4046-51.
66. Mackay, J. and O. Landt, *Real-time PCR fluorescent chemistries*. *Methods Mol Biol*, 2007. 353: p. 237-61.
67. Al-Soud, W.A., et al., *Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of Helicobacter species*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005. 44(2): p. 177-82.
68. Malorny, B., et al., *Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens*. *Int J Food Microbiol*, 2003. 83(1): p. 39-48.
69. De Bièvre, P. and H. Günzler, *Validation in Chemical Measurement*, ed. Springer. 2005. 166 sider.
70. MacKay, I.M., ed. *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. 1 ed. 2007, Caister Academic Press. 454 pages

71. Rabenau, H.F., et al., *Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology*. J Clin Virol, 2007. 40(2): p. 93-8.
72. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
73. Poon, L.L., et al., *A one step quantitative RT-PCR for detection of SARS coronavirus with an internal control for PCR inhibitors*. J Clin Virol, 2004. 30(3): p. 214-7.
74. Hoorfar, J., et al., *Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays*. J Clin Microbiol, 2004. 42(5): p. 1863-8.
75. Edberg, A., et al., *A comparative study of three different PCR assays for detection of Mycoplasma genitalium in urogenital specimens from men and women*. J Med Microbiol, 2008. 57(Pt 3): p. 304-9.
76. Alvarez, R.A., M.W. Blaylock, and J.B. Baseman, *Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Mycoplasma genitalium binds mucin*. Mol Microbiol, 2003. 48(5): p. 1417-25.
77. RocheMolecularSystems, *Cobas TaqMan CT Test, v 2.0*, in *In-vitro diagnostikum*. 2008.
78. Jensen, J.S., et al., *Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of Mycoplasma genitalium and Chlamydia trachomatis by polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic*. Sex Transm Dis, 2004. 31(8): p. 499-507.
79. Rours, G.I., et al., *Use of pooled urine samples and automated DNA isolation to achieve improved sensitivity and cost-effectiveness of large-scale testing for Chlamydia trachomatis in pregnant women*. J Clin Microbiol, 2005. 43(9): p. 4684-90.
80. Dreier, J., M. Stormer, and K. Kleesiek, *Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays*. J Clin Microbiol, 2005. 43(9): p. 4551-7.
81. Biochemicals, R.M., *LightCycler, Optimization Strategy*, in *Technical Note No. LC 9*. 2000.
82. *DNA and RNA Molecular Weights and Conversions*.
http://www.ambion.com/techlib/append/na_mw_tables.html
83. Rosenstraus, M., et al., *An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance*. J Clin Microbiol, 1998. 36(1): p. 191-7.

84. Moi, H., N. Reinton, and A. Moghaddam, *Mycoplasma genitalium is associated with symptomatic and asymptomatic non-gonococcal urethritis in men*. Sex Transm Infect, 2009. 85(1): p. 15-8.
85. Blaylock, M.W., et al., *Determination of infectious load of Mycoplasma genitalium in clinical samples of human vaginal cells*. J Clin Microbiol, 2004. 42(2): p. 746-52.
86. Fraser, C.G., et al., *Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1992. 30(5): p. 311-7.
87. Peters, E.H., et al., *Quality-controlled measurement methods for quantification of variations in transcript abundance in whole blood samples from healthy volunteers*. Clin Chem, 2007. 53(6): p. 1030-7.
88. Toye, B., et al., *Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for Chlamydia trachomatis testing*. J Clin Microbiol, 1998. 36(8): p. 2356-8.
89. Betsou, F., et al., *Construction and evaluation of internal control DNA for PCR amplification of Chlamydia trachomatis DNA from urine samples*. J Clin Microbiol, 2003. 41(3): p. 1274-6.
90. Wilcox, M.H., et al., *Combined cervical swab and urine specimens for PCR diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infection*. Sex Transm Infect, 2000. 76(3): p. 177-8.
91. Saah, A.J. and D.R. Hoover, *"Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings*. Ann Intern Med, 1997. 126(1): p. 91-4.
92. D'Aquila, R.T., et al., *Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating*. Nucleic Acids Res, 1991. 19(13): p. 3749.
93. Rijpens, N.P. and L.M. Herman, *Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens*. J AOAC Int, 2002. 85(4): p. 984-95.
94. Henry, R.J. and M. Segalove, *The running of standards in clinical chemistry and the use of the control chart*. J Clin Pathol, 1952. 5(4): p. 305-11.
95. Westgard, J.O., et al., *A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry*. Clin Chem, 1981. 27(3): p. 493-501.
96. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J Biomol Tech, 2004. 15(3): p. 155-66.
97. Bio-Rad Laboratories, I., *Real-Time PCR Applications Guide*. 2006.

98. Longo, M.C., M.S. Berninger, and J.L. Hartley, *Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions*. *Gene*, 1990. 93(1): p. 125-8.
99. Kalland, K.H., H. Myrmel, and S.A. Nordbo, *[Nucleic-acid based diagnostics in clinical microbiology]*. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2005. 125(22): p. 3110-4.

Brukerveiledning og samsvarsvurdering

Reagenser til kvalitativ påvisning av *Mycoplasma genitalium* DNA med LightCycler 480. Analysen inneholder i tillegg en intern hemmerkontroll (IC), for å avsløre om det er hemmende forbindelser av amplifikasjonen i prøvematerialet.

Reagenser

Primere og prober blandes sammen med nukleasefritt vann til en CE-merket bruksløsning (primermiks) som oppbevares mørkt ved 2-8 °C i 6 måneder.

Tabell 14. Primer og probesekvenser for påvisning av *Mycoplasma genitalium* G37 DNA.

Aksesjonsnummer *gap* gen: L43967, gi: 84626123 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) og phage MS2 DNA (IC).

Oligonukleotid	<i>Mycoplasma genitalium</i> , glyceraldehyde-3-phosphate (<i>gap</i>) gen	Konsentrasjon i PCR-miks µM	L43967
Mgen 01 – Forward	5' GCTTGATTTACTTGTTCAACAGATGGAC-3'	1,0	371170 - 371197
Mgen B – Reverse	5' AACGCTTACAAGATGCTCCTCATA-3'	1,0	371395 - 371372
MgGAP TM - Reverse	5' FAM ^a -TCCAGAAGCAAATGGCAAACCTTAATGGG- BBQ ^b -3'	0,4	371289 - 371262
MS2 – Forward	5' TGCTCGCGGATACCCG -3'	0,5	
MS2 – Reverse	5' AACTTGCGTTCTCGAGCGAT -3'	0,5	
MS2-TM – Forward	5' Texas Red-ACCTCGGGTTCCGCTTGCTCGT- BBQ ^b 3'	0,2	

^a 6-carboxyfluorescein

^b Black Berry Quencher

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe, 12239272001, Roche Applied Science.

FastStart <i>Taq</i> DNA polymerase med reaksjonsbuffer og dNTP (dUTP i stedet for dTTP)	}	To komponent løsning.
MgCl ₂		Oppbevares < -18 °C
Nukleasefritt vann		Oppbevares 2-8 °C
<i>UNG (Uracyl-N-Glycosylase)</i> ,		Oppbevares 2-8 °C
Eurogentec S.A. Belgia (Medprobe, Norge)		Oppbevares < -18 °C.
Positiv kontrollmateriale:		
Fortynnet <i>Mycoplasma genitalium</i> G37, ATCC 33530		Oppbevares < -18 °C.
<i>Non Template Control</i> (NTC): Nukleasefritt vann.		Oppbevares 2-8 °C.

Det er ifølge databladene til reagensene ikke oppgitt at de inneholder humane komponenter eller helsefarlige forbindelser. Vanlig forhåndsregler for kjemikalier må følges.

Introduksjon

Bakterien er seksuell overførbart og assosiert med uretritt og cervisitt.

Analysen er tiltenkt brukt for pasienter med symptomer på uretritt eller cervisitt, men også i tilfeller med en mer komplisert klinikk som epididymitt, prostatitt og underlivsbetennelse hos kvinner. Analysen skal kun brukes kvalitativt med påvist eller ikke påvist som svar.

Prøvematerialene som kan anvendes er urin og cervikalt sekret.

Beskrivelse

En sekvens på 226 basepar fra genomet til *M. genitalium* (*gap*) kopieres med spesifikke primere, og detekteres med en TaqMan probe på LightCycler 480. For å kunne detektere gensekvensen til *M. genitalium* må den kopieres i et tilstrekkelig antall. Kopieringen skjer med vanlig PCR metode. En TaqMan probe, merket med *6-carboxyfluorescein* (FAM) som *Reporter* og *Black Berry Quencher* (BBQ) som *Quencher*, hybridiserer til templatet mellom de to primerne. Proben blir kløvd av DNA polymerase, *Fluorescence Resonance Energy* (FRET) opphører, og fluorescens detekteres. En sekvens på 61 basepar fra plasmidet *MS2* DNA (IC) kopieres samtidig med en TaqMan probe, merket med en annen fluorofor (*Texas Red*). Real-time PCR analysen utføres på LightCycler 480. Instrumentet er vedlikeholdsfritt og kan ikke kalibreres. Temperatursjekk gjennomføres av instrumentet.

Verifisering og validering

Metoden er verifisert og validert etter retningslinjene fra Sloan [63]. Alle opplysningene fra disse eksperimentene er lagret i en perm som er lett tilgjengelig for gjennomsyn.

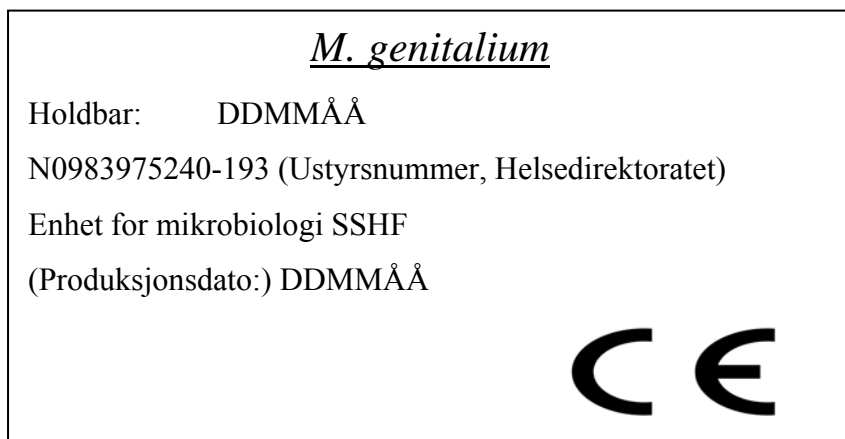
Ett oppsett skal alltid inneholde minst en positiv kontroll og en NTC. Real-time PCR prosessen overvåkes ved å notere C_T -verdien til positiv kontroll i et loggskjema. Etter 20 observasjoner beregnes middelveidien og grenseverdiene i et Levey-Jennings diagram [94]. C_T - verdien til den positive kontrollen overvåkes etter Westgaard regler [95]. Faller C_T - verdien til positiv kontroll utenfor 3 SD, repeteres amplifikasjonen. Ved to påfølgende resultater utenfor 2 SD, må nye reagenser eller en ny lot. med positiv kontroll tas i bruk.

Sensitivitet

LOD₉₅ er 35 bakteriegenom/reaksjon.

Produksjon av primermiks

Primere og prober produseres av Tib-Molbiol og mottas i frysetørret form. Et sertifikat medfølger hvert oligonukleotid med en nøyaktig volumangivelse av nukleasefritt vann for å oppnå en konsentrasjon på 100 μ M. For å sikre sporbarhet skal dokumentasjon av prepareringen med oligonukleotidene inneholde lot.nummer, mengde vann tilsatt, operatørens identitet og dato. Oligonukleotidene oppbevares mørkt ved < -70 °C. Dokumentasjon av produksjonen av primermiksen skal inneholde mengden vann som er tilsatt, oligonukleotider med lot. nummer, operatørens identitet, produksjonsdato og holdbarhetsdato. Enzymer, dNTP og magnesium fra ulike produsenter blandes sammen med primermiksen til en PCR-miks. Konsentrasjonene til reagensene er optimaliserte i forhold til hverandre, for å gi en stabil og effektiv amplifikasjon. Arbeidet må utføres i et "DNA fritt" kabinett, og det må til enhver tid føres lot.nummer for alle reagensene som er i bruk for å sikre sporbarhet. For opplæring, utstyrskontroll, avfallshåndtering osv. følges de generelle prosedyrene til Enhet for mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF.



Figur 13. CE-merke som skal påføres primermiks.

Preparering av PCR-miks

PCR miksen tilblendes i et DNA fritt kabinett like før amplifisering. 15 µl fordeles i hver brønn på reaksjonsbrettet (AB70659, BIOplastics, Landgraaf, Nederland). 5 µl prøve (templat), eller kontroll, tilsettes brønnene utenfor kabinettet, og forsegles med EU-Opti-Seal (BIOplastics, Landgraaf, Nederland). Reaksjonsbrettet sentrifugeres kort (ca. 5 sekunder) før amplifikasjon.

Tabell 15. Tilsetningsvolum av reagenser i PCR-miks for påvisning av *M. genitalium* DNA med IC på LightCycler 480. Totalvolum 20 µl.

Reagenser	Mengde pr. reaksjon
25 mM MgCl ₂	3,2 µl
FastStart Taq DNA Polymerase	2,0 µl
Primermiks (Mgen og MS2)	9,3 µl
UNG	0,5 µl
Prøve (templat med IC)/kontroll	5,0 µl
Volum	20,0 µl

5000 kopier (5 µl) MS2 DNA tilsettes 200 µl urin eller cervikalt sekret før ekstraksjon.

Ved maksimalt utbytte blir konsentrasjonen av MS2 DNA 250 kopier/PCR reaksjon.

Tabell 16. Amplifikasjonsprogram for påvisning av *M. genitalium* DNA med IC på LightCycler 480.

Program	Temperatur	Tid
UNG aktivering	50 °C	2:00
FastStart Enzym	95 °C	10:00
Denaturering	95 °C	} 45 sykluser
Hybridisering	60 °C	
Elongering	72 °C	
Avkjøling	40 °C	0:20

Dataanalyse

Resultatene fra *M. genitalium* vises i kanal 440-510 nm.

Resultatene fra IC vises i kanal 533-640 nm.

Se brukermanualen til LightCycler 480 for detaljer.

Vurdering av resultat**Tabell 17. Oversikt over tolking av resultater.**

<i>M. genitalium</i> (prøve)	Intern hemmerkontroll (prøve)	NTC ¹	Resultat
Negativ	Positiv	Negativ	Negativ
Positiv	Ikke relevant	Negativ	Positiv
Negativ	Negativ	Ikke relevant	PCR feil. Analysen repeteres ufortynnet og i 1:10 fortyning.
Positiv	Ikke relevant	Positiv	Kontaminasjon. Analysen repeteres

¹NTC-Non Template Control

Positive resultater med C_T-verdi >38-40 må repeteres. Resultatet av den siste amplifikasjonen blir tellende.

C_T-verdi >40 svares negativ.

Tiltak hvis analysen ikke kan utføres

SSHF sender prøvene til St Olavs hospital for å forhindre forsinkelse av resultatene.

Melding ved feil, skader uhell og svikt

Feil ved utstyr, samt skader, uhell og svikt der medisinsk utstyr er, eller kan ha vært involvert, skal meldes til myndighetene. Feilene må være av en så alvorlig art at det kan føre til systematiske falske negative, eller falske positive resultater, eller være en fare for laboratoriepersonalets helse.

Valideringsrapport

M. genitalium Real-time PCR

Bakgrunn

Validering er en kontinuerlig overvåkingsprosess som pågår etter at verifiseringseksperimentene er ferdig, og tilfredsstillende de krav som er satt. Laboratoriet som utfører analysen overvåker prosessen og er ansvarlig for opprettholde stabilitet og yteevne over tid. Valideringsprosessen omfatter reagenser, instrumenter og analytikernes kompetanse og evne til å produsere presise og nøyaktige resultater.

Beskrivelse

En sekvens på 226 basepar fra genomet til *M. genitalium* (*gap*) kopieres med spesifikke primere og detekteres med en TaqMan probe på LightCycler 480.

For å kunne detektere gensekvensen til *M. genitalium* må den kopieres i et tilstrekkelig antall. Kopieringen skjer med vanlig PCR metode. En TaqMan probe, merket med 6-*carboxyfluorescein* (FAM) som *Reporter* og *Black Berry Quencher* (BBQ) som *Quencher*, hybridiserer til templatet mellom de to primerne. Proben blir kløvd av DNA polymerase, *Fluorescence Resonance Energy* (FRET) opphører, og fluorescens detekteres.

En sekvens på 61 basepar fra plasmidet *MS2 DNA* (IC) kopieres samtidig med en TaqMan probe, merket med en annen fluorofor (*Texas Red*).

Real-time PCR analysen utføres på LightCycler 480. Instrumentet er vedlikeholdsfritt og kan ikke kalibreres. Temperatursjekk gjennomføres av instrumentet.

Formål

Validering av en Real-time PCR analyse for påvisning av *M. genitalium* DNA og IC i kliniske urinprøver og endocervikale prøver. Analysen skal tas i bruk ved Enhet for Mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF etter at den er validert.

Validering

- Den enkelte analytiker er i stand til å gjenta oppsett med godkjente positive og negative kontroller over tid, med forskjellige lot. nummer av reagenser.
- SLP-samarbeid med Fürst Medisinsk Laboratorium én gang i året er etablert.
- 25 ekstraherte urinprøver og 25 endocervikale prøver med *M. genitalium* DNA og 25 ekstraherte urinprøver og 25 endocervikale prøver uten *M. genitalium* DNA er brukt til valideringen (Tabell 10).
- Effektivitetstest. Effektiviteten til amplifikasjonen må ligge mellom 90-110 % [64, 72].

Sammendrag

Real-time PCR analysen detekterer *gap*-genet til *M. genitalium* i 50 av 50 prøver som tidligere er påvist med en annen analyse. Det var også full overensstemmelse mellom prøvene uten *M. genitalium* DNA.

Middelverdien (CT-verdi) til positiv kontroll er beregnet fra 20 separate kjøring. Positiv kontroll er innenfor Westgaards regler og godkjent i alle oppsett. Godkjenningen gjelder for alle opplærte analytikere, og ved alle brukte lot. nummer av reagenser.

Effektiviteten til amplifikasjon var på 107 % og 108 % for henholdsvis urin og cervikalt sekret.

Et SLP-samarbeid med Fürst Medisinsk Laboratorium er etablert i påvente av eksterne SLP-leverandører.

Utarbeidet av: _____ Dato: _____

Gjennomgått av: _____ Dato: _____

Godkjent av: _____ Dato: _____

Samsvarserklæring

Sørlandet sykehus HF Kristiansand

Enhet for mikrobiologi

Serviceboks 416

Egsveien 100

4604 KRISTIANSAND

Produkt

DNA påvisning av *M. genitalium* med Real-time PCR.

Vi erklærer herved at nevnte produkt er i overensstemmelse med de relevante grunnleggende krav gitt i IVD direktivet. *M. genitalium* står ikke på liste A eller B over infeksjose agens som representerer en risiko for pasienter i tilfelle svikt.

Utarbeidet av: _____ Dato: _____

Funksjon: _____

På vegne av produsenten:

Godkjent av: _____ Dato: _____

Funksjon: _____