

# Implementering av Amplidiag® *H. pylori*+ ClariR för *Helicobacter*-PCR från biopsier

Raged El-Ali, Ilona Vereb, Ann Cathrine Petersson, Klinisk Mikrobiologi, Labmedicin, Sölveg 23, Lund, Region Skåne

**Bakgrund:** Amplidiag® *H. pylori*+ClariR PCR-kit är CE-IVD-godkänt för att påvisa *H. pylori* i faeces. Målet för denna studie var att utvärdera detta kit för diagnostik av *Helicobacter pylori* i ventrikelbiopsier.

Kitet inkluderar reagenser för samtidig amplifiering av *Helicobacter*, vildtypen (WT; klaritromycin-känslig) och muterad variant av 23S rDNA (resistent), samt intern amplifieringskontroll.

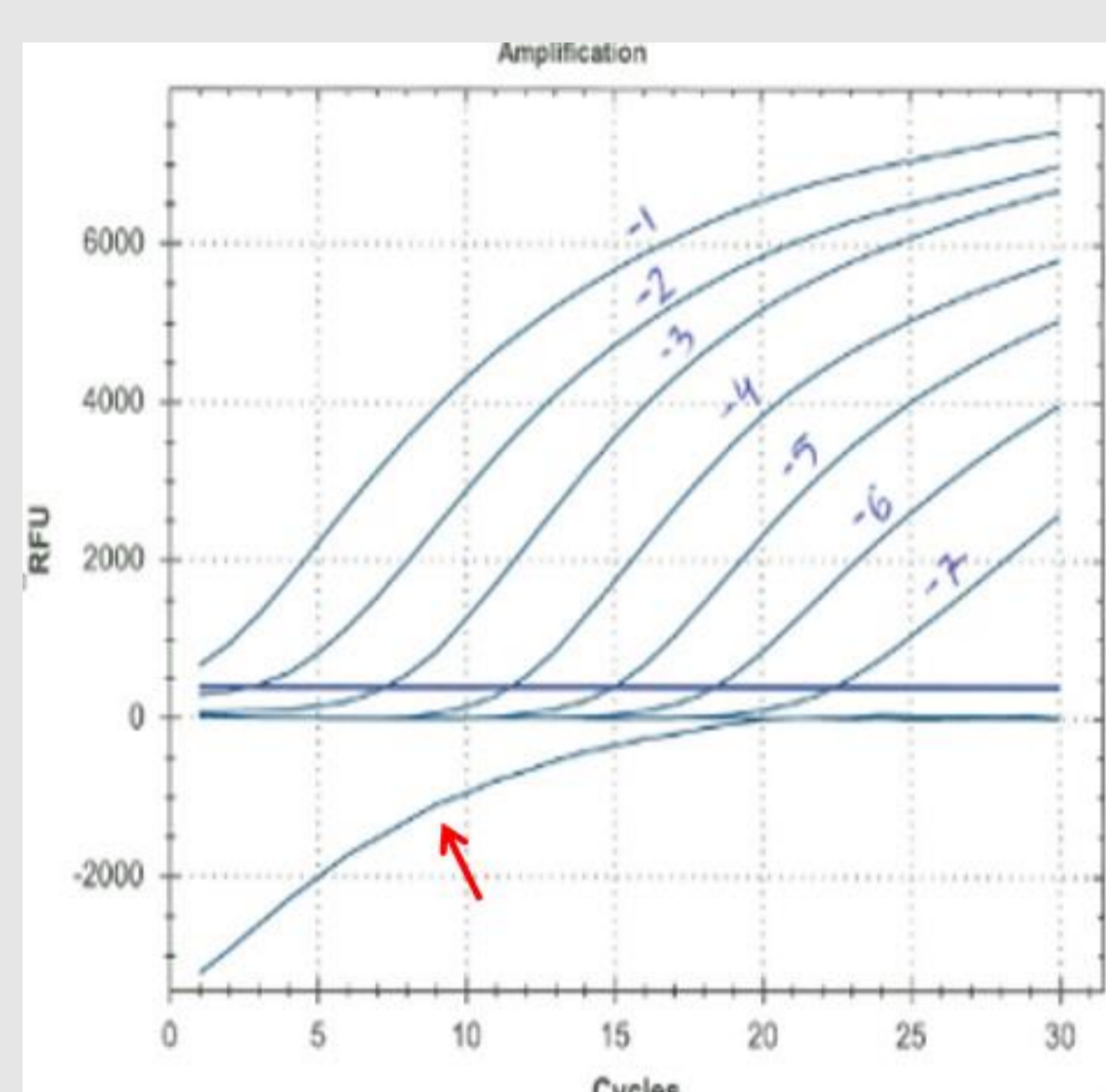
**Material och metoder:** Totalt 90 kliniska prover, klaritromycin-känslig respektive resistent referensstam, samt två paneler från INSTAND kvalitetsprogram, inkluderades.

In-house realtids-PCR med FRET-prober och smältpunktanalys på Light Cykler och DNA-extraktion på MagNa Pure LC (Roche) utgjorde referensmetod.

För DNA-extraktion utvärderades MagNa Pure 96 (Roche) och EZ1 (Qiagen) med tillhörande extraktionskit.

Amplifiering utfördes på CFX96 (Bio-Rad)

## Resultat: Amplifiering



Amplifieringskurvor från analys av positiv kontroll i spädningsserie från ca  $10^9$  till  $10^2$  CFU/ml. Vid höga halter av DNA kunde positiv signal missas (röd pil).

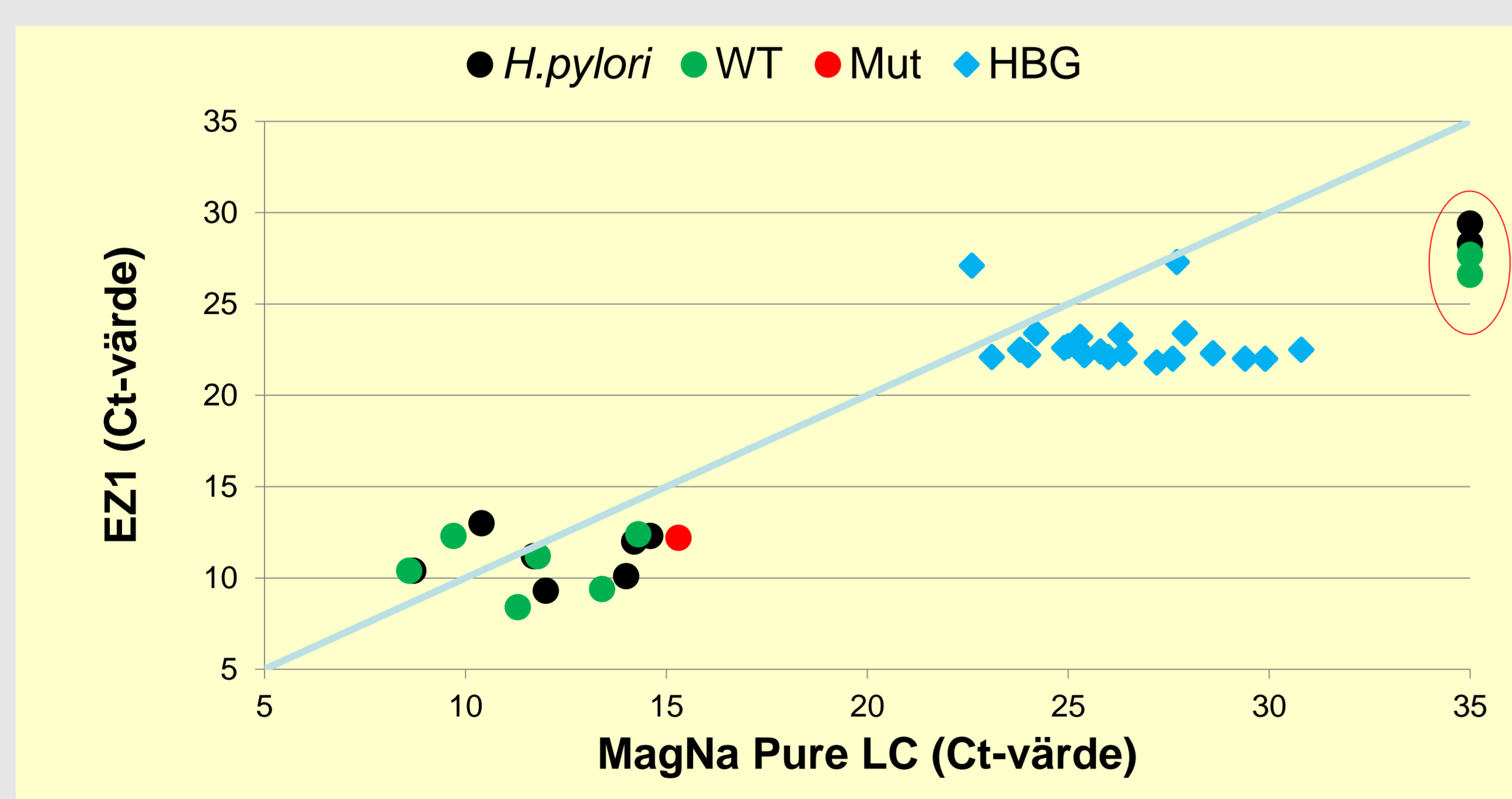
- Antalet cykler i steg 2 av amplifieringsprotokollet minskades från 15 till 10.
- Steg 1 och 3 oförändrade.

**Analytisk sensitivitet** fastställdes till  $<10^2$  CFU/ml.

**Analytisk specificitet** var densamma som för in-housemetoden. Prov från INSTAND-paneler visade att båda metoderna även identifierade såsom *H. felis* och *H. mustelae*.

Koinfektion *H. pylori* – andra arter diskuteras men ev. sjukdomsframkallande förmåga hos människor av andra arter är inte fastställd än.

## Resultat: DNA-extraktion



Jämförelse av Ct-värden efter extraktion med EZ1 och MPLC.

- ❖ Förbehandling av prov och extraktion med EZ1 med tillhörande reagenser gav samlade Ct-värden och fler positiva prover (inom röd ring) än MPLC.
- ❖ Prov extraherade med MP96 behövde spädas för att undvika inhibition.
- EZ1 med tillhörande reagenser valdes för extraktion.

## Resultat: In house vs Amplidiag

Analys av kliniskt material.

### Amplidiag versus In house

		In house		Antal
		+	-	
Amplidiag	+	40	5	45
	-	0	45	45
Antal		40	50	90

- Sensitivitet 100 %
- Specificitet 90 %  
(Lågt antal negativa prover analyserade.)

### Resultat (Ct-värden) med Amplidiag från prov negativa med In-housemetoden

Prov	Hp	WT	Mut	Bedömning
360	27,0	26,1	-	Svagt +. Rest-DNA efter behandling
369	9,8	9,3	-	Sant positiv
447	23,8	-	22,8	Svagt +. Rest-DNA efter behandling
561	28,3	26,6	-	Svagt +. Rest-DNA efter behandling
576	29,4	29,7	-	Svagt +. Rest-DNA efter behandling

## Konklusion

- Amplidiag® *H. pylori*+ClariR, med modifierat protokoll, ger en snabb och god diagnostik av *Helicobacter* från ventrikelbiopsier
- Applikationen ger lättolkade resultat med högre sensitivitet och likvärdig specificitet som befintlig in-house metod

Metoden har implementerats vid Klinisk mikrobiologi Skåne

