

RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii

REF PG1905



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y cuantitativa directa de *Pneumocystis jirovecii* a partir de líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humano.^{1,2}

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii está concebido como una ayuda para el diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por *Pneumocystis jirovecii*.

2. Resumen y descripción del ensayo

Pneumocystis jirovecii (antes *P. carinii*) pertenece a la familia *Pneumocystidaceae* y puede ocasionar neumonía intersticial. Las infecciones oportunistas son un problema importante en pacientes inmunodeprimidos, como los pacientes con VIH/SIDA, los pacientes tratados con quimioterapia o las personas que reciben un trasplante de órganos. El hongo *Pneumocystis jirovecii* causa infecciones respiratorias y es la enfermedad oportunista más frecuente en personas infectadas por el VIH.

Pneumocystis jirovecii no causa ningún daño en personas sanas y está muy extendido entre la población normal. No obstante, las personas inmunodeprimidas infectadas con *Pneumocystis jirovecii* desarrollan neumonía, con síntomas que incluyen tos seca, dificultad para respirar, taquipnea y fiebre.³ Aunque el tratamiento HAART redujo la incidencia de *Pneumocystis jirovecii* en 3.4 % por año desde 1996, se calcula que un 9 % de los pacientes hospitalizados con VIH/SIDA y 1 % de los receptores de trasplantes de órganos sólidos aún están infectados.⁴ Según los Centros estadounidenses para el control de enfermedades (CDC), *Pneumocystis jirovecii* causa una mortalidad del 100 % en los pacientes sin tratamiento, y la tasa de mortalidad en los pacientes inmunodeprimidos es de entre el 5 % y el 40 % en los pacientes tratados.⁴ La mortalidad por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes no infectados con el VIH puede alcanzar el 40 %.⁵ Hasta ahora, la detección de *Pneumocystis jirovecii* se hacía por tinción inmunofluorescente. Sin embargo, debido a su baja sensibilidad, se ha sustituido por la PCR.²

3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y cuantitativa directa de *Pneumocystis jirovecii* a partir de líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humano.

Después del aislamiento del ADN, ocurre la amplificación del fragmento génico (si está presente) específico de *Pneumocystis jirovecii* (mt LSU; subunidad grande). Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la Taq-polymerase rompe la

proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. Con los estándares **Standard A**, **Standard B** y **Standard C**, incluidos en el kit, es posible cuantificar los resultados. El kit de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii contiene un **Internal Control DNA** (ICD) que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul
10 ¹	Standard A	1x	100 µl	azul oscuro
10 ³	Standard B	1x	100 µl	azul oscuro
10 ⁵	Standard C	1x	100 µl	azul oscuro

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (entre 2 °C y 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras de lavado broncoalveolar (LBA)

Para el aislamiento del ADN a partir de lavado broncoalveolar (LBA), use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®]GENE Pneumocystis jirovecii contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo deben incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control**, el **Internal Control DNA**, y el **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Agregue 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Estándar (A, B, C): Agregue 5 µl de **Standard** (A, B, C) a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR de los estándares.

Nota: El uso de los siguientes cicladores requiere que se incluya una curva estándar en cada análisis: ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad).

Para todos los demás cicladores, solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (**Standard B**) en la preparación experimental como calibrador para cada nuevo análisis de PCR en tiempo real. Aquí, solo es necesaria la aplicación de una curva estándar una vez por número de lote.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

Tabla 6: Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

Nota: El número total de copias por reacción de **Standard A**, **Standard B** y **Standard C** debe anotarse en el archivo de configuración (archivo Setup) del programa de software del ciclador de la PCR en tiempo real que corresponda. Se emplea un volumen total de 5 µl de ADN para obtener las siguientes concentraciones:

Estándar A: 5×10^1 copias/reacción

Estándar B: 5×10^3 copias/reacción

Estándar C: 5×10^5 copias/reacción

Nota: La curva estándar se puede guardar, para cada parámetro, en el ciclador de la PCR en tiempo real. Excepto en los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad), solo es necesario obtener la curva estándar una vez por cada número de lote. Los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad) requieren que se incluya una curva estándar en cada análisis. En todos los demás cicladores solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (**Standard B**) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de

PCR en tiempo real. No obstante, la recomendación general es evaluar siempre los tres estándares en cada ensayo.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, CFX96™ y Rotor-Gene Q

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

Nota: El número total de copias por reacción de **Standard A, **Standard B** y **Standard C** debe anotarse en el archivo de configuración (archivo Setup) del programa de software del ciclador de la PCR en tiempo real que corresponda. Se emplea un volumen total de 5 µl de ADN para obtener las siguientes concentraciones:**

Estándar A: 5×10^1 copias/reacción

Estándar B: 5×10^3 copias/reacción

Estándar C: 5×10^5 copias/reacción

Nota: La curva estándar se puede guardar, para cada parámetro, en el ciclador de la PCR en tiempo real. Excepto en los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad), solo es necesario obtener la curva estándar una vez por cada número de lote. Los cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad) requieren que se incluya una curva estándar en cada análisis. En todos los demás cicladores solo es necesario incluir una muestra de la curva estándar (**Standard B**) como calibrador en la preparación experimental de cada nuevo análisis de PCR en tiempo real. No obstante, la recomendación general es evaluar siempre los tres estándares en cada ensayo.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

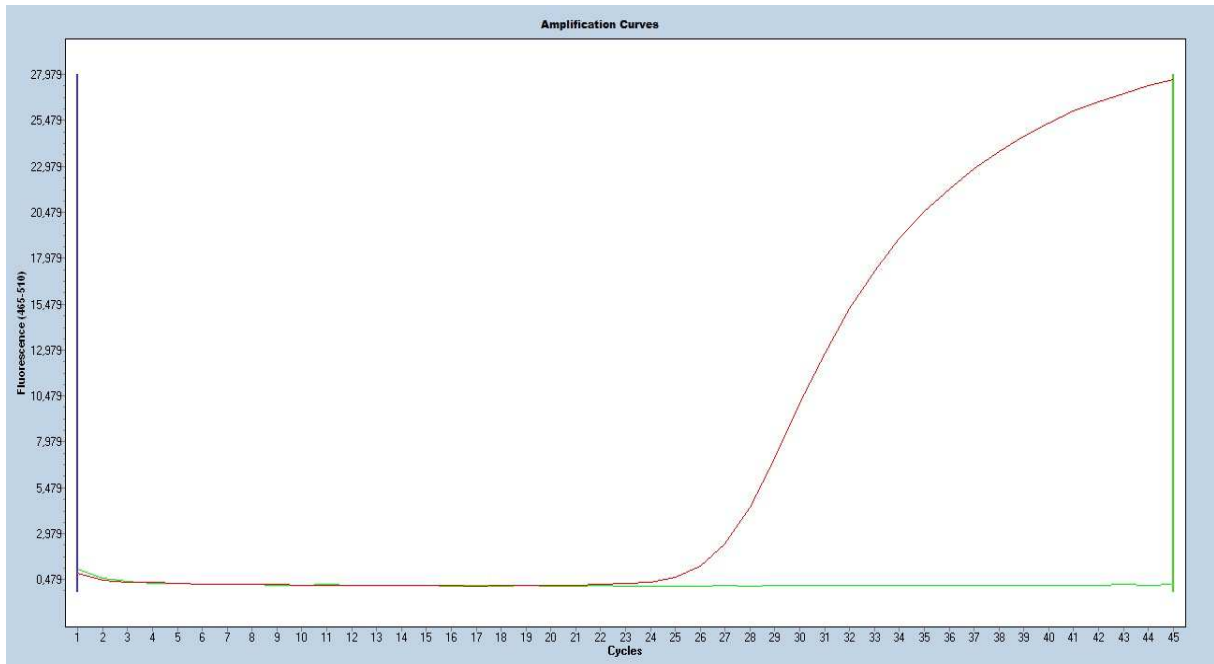


Fig. 1: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Pneumocystis jirovecii*) en el LightCycler® 480II

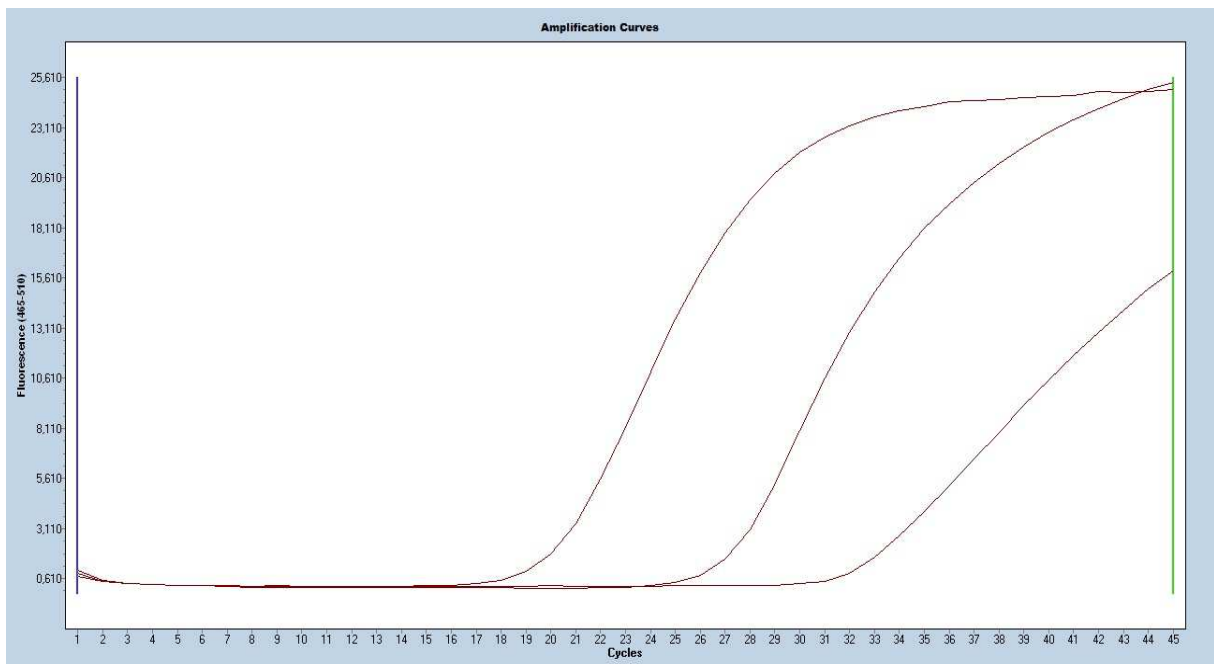


Fig. 2: Serie de estándares de *Pneumocystis jirovecii* con **Standard A** (10^1 copias de ADN por μl), **Standard B** (10^3 copias de ADN por μl) y **Standard C**. (10^5 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

10.1 Validez de la detección cuantitativa

Para que la prueba diagnóstica cuantitativa sea válida, se deben cumplir todas las condiciones de control de una prueba diagnóstica cualitativa válida. Además, para obtener resultados de cuantificación exactos, se debe generar también una curva estándar válida. Para tener una prueba diagnóstica cuantitativa válida, los parámetros de control de la curva estándar deben alcanzar los siguientes valores.

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

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	<i>Pneumocystis jirovecii</i> detectado
negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	No válido

Pneumocystis jirovecii se detecta si el ADN de la muestra y el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

Pneumocystis jirovecii también se detecta si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

Pneumocystis jirovecii no se detecta si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra y del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

11.1 Cuantificación de las muestras

Para cuantificar las muestras positivas para *Pneumocystis jirovecii*, se debe procesar por separado una curva estándar con el **Standard A**, el **Standard B** y el estándar **Standard C**. La medición de la curva estándar debe guardarse aparte. No obstante, se puede usar la medición de la misma curva estándar en todos los análisis con productos del mismo número de lote, importando el experimento guardado.

Nota: Esto no es válido con los siguientes cicladores: ABI 7500 (Applied Biosystems) y CFX96™ (Bio-Rad). Aquí, es necesario medir una curva estándar con cada análisis.

Para todos los demás cicladores, es necesario incluir una muestra de la curva estándar (Standard B**) en la preparación experimental como calibrador para cada nuevo análisis de PCR en tiempo real.**

Para cuantificar las muestras positivas a *Pneumocystis jirovecii*, se tienen que seleccionar todas las muestras de estándar (A, B y C), los controles positivo y negativo y las muestras problema que se desea cuantificar, y analizarlas siguiendo las instrucciones del fabricante del ciclador. Los resultados de cuantificación correctos solo son confiables si los valores de Ct del gen diana específico de *Pneumocystis jirovecii* (mt LSU; subunidad grande) se pueden detectar dentro del intervalo de Ct estándar.

Con el ensayo cuantitativo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii*, se calcula la cantidad de ADN en copias/reacción del parámetro. La conversión a copias/ml se lleva a cabo con un factor de corrección K y tiene en cuenta las diluciones del procedimiento de extracción (dependiendo del kit de extracción usado) y la preparación de la PCR.

La conversión del resultado del ensayo cuantitativo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii* en copias/ml se calcula con la siguiente fórmula:

$$C \text{ [copias/ml]} = c \text{ [copias/reacción]} \times K$$

- C [copias/ml] - concentración de la muestra en copias/ml de muestra
 c [copias/reacción] - concentración de ADN en la reacción de PCR (resultado de la PCR cuantitativa)
 K - factor de corrección

Para calcular el factor de corrección, hay que tener en cuenta la siguiente información:

- Dilución de las muestras
- Volumen inicial de muestra para la extracción del ADN
- ADN extraído del eluato total usado para la reacción de PCR

Tabla 12: Ejemplo del cálculo del factor de corrección K con el Maxwell® RSC (Promega)

Descripción	Factor
300 µl de muestra usada para la extracción*, eluida en un volumen final de 60 µl	Ningún factor
5 µl de extracto de ADN usado para la PCR (60 µl de eluato total =1/12)	x 12
300 µl de muestra escalados a 1 ml*	x 3,3
Factor de corrección K para <i>Pneumocystis jirovecii</i>	40

* El resultado se basa en 1 ml de material inicial de LBA

Nota: Para obtener más información sobre la cuantificación de las muestras, póngase en contacto con pcr@r-biopharm.de.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo está validado únicamente para muestras de líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humano.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®] GENE Pneumocystis jirovecii.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana ((mt LSU; subunidad grande).

13. Características de rendimiento

13.1 Rendimiento clínico

En un estudio de validación clínica retrospectivo se analizaron 203 muestras extraídas (LBA) con el ensayo RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii* y con un ensayo de PCR en tiempo real interno, en un laboratorio en Alemania.

Tabla 13: Correlación de los resultados de *Pneumocystis jirovecii* entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii* y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Positivo	28	2 ^{b)}	30	Concordancia pos.: 91,8 %
	Negativo	3 ^{a)}	170	173	Concordancia neg.: 98,6 %
	Total	31	172	203	

a) Tres (3) muestras estuvieron por debajo del límite de detección (LD) del ensayo RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii*, y mostraron un valor de $C_p > 35$ en el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

b) Dos (2) muestras estuvieron por debajo del límite de detección (LD) del ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia, y mostraron un valor de $C_p > 33$ en el ensayo RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii*.

13.2 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii* tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción para *Pneumocystis jirovecii*.

En la figura 2, a continuación, se muestra una dilución seriada de *Pneumocystis jirovecii* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

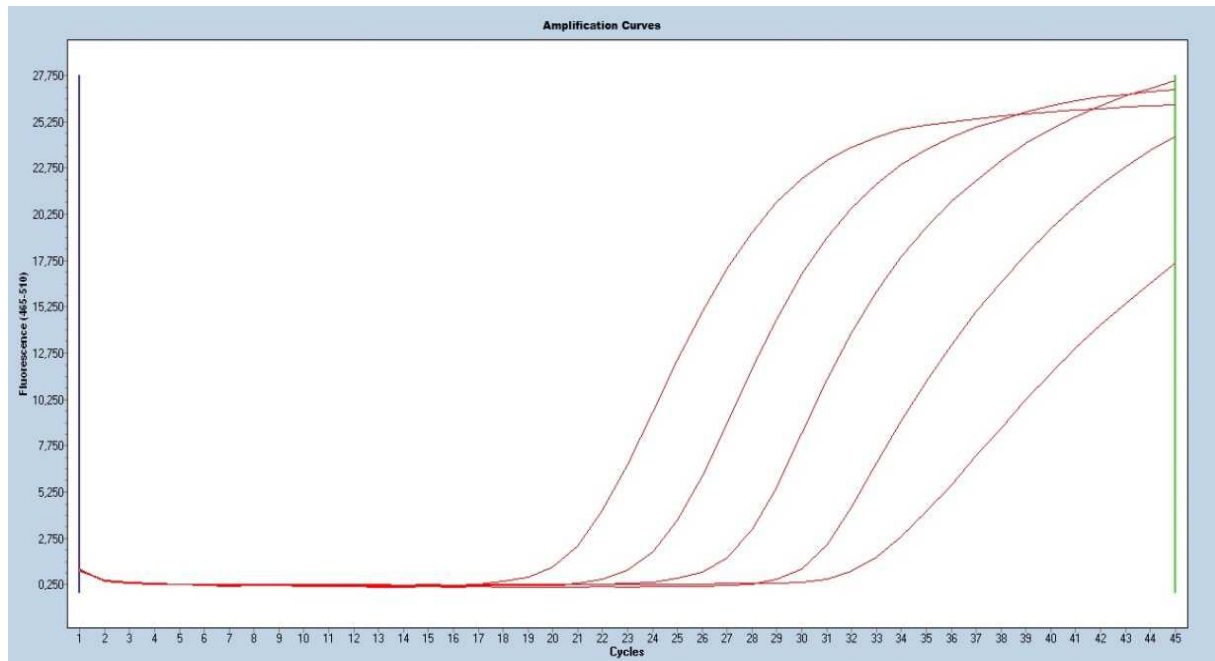


Fig. 2: Dilución seriada de *Pneumocystis jirovecii* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.3 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii es específico para *Pneumocystis jirovecii*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 14, * detectada mediante alineación de secuencias):

Tabla 14: Ensayos de reactividad cruzada










<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Rhizomucor pusillus</i>	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	Coxsackie B4, humano	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	Citomegalovirus, humano	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Scedosporium apiospermum</i>	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Doratomyces microsporus</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Scedosporium prolificans</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	-	Virus Epstein-Barr, cepa B95-8	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	<i>Fusarium solani</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Virus paragripal 1, humano, cepa C35	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Helicobacter felis</i>	-	Virus paragripal 2, humano, cepa Greer	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	Virus paragripal, serotipo 3	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobioceticus</i> R22	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	Virus paragripal 4b, humano, cepa CH19503	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Metaneumovirus humano</i>	-	Virus sincitial respiratorio, humano, cepa 9320	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Cladosporium</i> spp	-	Virus de la gripe, A/PR/8/34, infeccioso	-	Virus sincitial respiratorio, humano, cepa Long	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Coronavirus 229E, humano	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Rinovirus, genogrupo A, humano	-	Virus de la varicela-zóster (tipo B)	-

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-07-22	4. Reactivos suministrados 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9.2 Preparación de la mezcla de PCR 9.3 Configuración del equipo de PCR 10. Control de calidad

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte las instrucciones de uso.
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

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