

## RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii*

**REF** PG1905



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE Pneumocystis jirovecii est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et quantitative directe de *Pneumocystis jirovecii* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain<sup>1,2</sup>.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE Pneumocystis jirovecii est destiné à faciliter le diagnostic des infections respiratoires provoquées par *Pneumocystis jirovecii*.

## 2. Résumé et explication du test

*Pneumocystis jirovecii* (auparavant *P. carinii*) appartient à la famille des *Pneumocystidaceae* et peut occasionner une pneumopathie interstitielle. Les infections opportunistes représentent un problème sérieux chez les patients immunodéprimés, par exemple les patients atteints par le VIH/sida, les patients sous chimiothérapie et les patients ayant reçu une greffe d'organe. *Pneumocystis jirovecii* provoque des infections respiratoires et les infections opportunistes les plus couramment observées chez les personnes infectées par le VIH. *Pneumocystis jirovecii* est inoffensif chez les personnes en bonne santé et très largement répandu parmi la population normale. Cependant, les personnes immunodéprimées infectées par *Pneumocystis jirovecii* développent une pneumonie avec des symptômes tels que toux sèche, essoufflement, tachypnée et fièvre<sup>3</sup>. Même si la thérapie antirétrovirale hautement active a diminué l'incidence de *Pneumocystis jirovecii* de 3,4 % par an après 1996, on estime que 9 % des patients hospitalisés atteints par le VIH/sida et 1 % des bénéficiaires d'une transplantation d'organe solide sont encore infectés<sup>4</sup>. Selon le Centre de contrôle des maladies (CDC), *Pneumocystis jirovecii* entraîne une mortalité de 100 % chez les patients non traités et le taux de mortalité chez les patients immunodéprimés varie de 5 % à 40 % chez les patients traités<sup>4</sup>. La mortalité due à *Pneumocystis jirovecii* chez les patients non infectés par le VIH peut atteindre 40 %<sup>5</sup>. Jusqu'à présent, *Pneumocystis jirovecii* était détecté par coloration par immunofluorescence. Cependant, étant donné la faible sensibilité de ce test, il est à présent remplacé par la PCR<sup>2</sup>.

### 3. Principe du test

RIDA<sup>®</sup>GENE *Pneumocystis jirovecii* est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et quantitative directe de *Pneumocystis jirovecii* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification du fragment de gène (si présent) spécifique à *Pneumocystis jirovecii* (mt LSU ; grande sous-unité). Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la [Taq-polymerase] rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Avec les standards, [Standard A], [Standards B] et [Standards C] inclus dans le kit, il est possible de quantifier les résultats. Le kit de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE *Pneumocystis jirovecii* contient un [Internal Control DNA] (ICD) qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante.

### 4. Contenu du paquet

**Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)**

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	[Reaction Mix]	2x	1050 µl	jaune
2	[Taq-Polymerase]	1x	80 µl	rouge
D	[Internal Control DNA]	2x	1700 µl	orange
N	[No Template Control]	1x	450 µl	blanc
P	[Positive Control]	1x	200 µl	bleu
10 <sup>^1</sup>	[Standard A]	1x	100 µl	bleu foncé
10 <sup>^3</sup>	[Standard B]	1x	100 µl	bleu foncé
10 <sup>^5</sup>	[Standard C]	1x	100 µl	bleu foncé

## 5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Pneumocystis peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

**Tableau 2** : Matériel nécessaire

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- Kit de compensation de couleur RIDA® GENE II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

## 7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation des échantillons à partir d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Pour isoler l'ADN à partir d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA), utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA<sup>®</sup> GENE Pneumocystis jirovecii inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], le [Positive Control], le [No Template Control], le [Internal Control DNA] et les [Standard A], [Standard B] et [Standard C] avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

**Tableau 3 :** Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

**Tableau 4 :** Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
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
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

**Contrôle négatif :** Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

**Échantillon :** Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif :** Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

**Standard (A, B, C) :** Ajouter 5 µl de **Standard** (A, B, C) au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de PCR des étalons.

**Remarque :** lorsque les thermocycleurs suivants sont utilisés, il faut inclure une courbe standard dans chaque analyse : ABI 7500 (Applied Biosystems) et CFX96™ (Bio-Rad).

Pour tout autre type de thermocycleur, seul un échantillon de la courbe standard (**Standard B**) doit être inclus dans la configuration expérimentale en tant que calibre pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel. Dans ce cas, il est seulement nécessaire d'appliquer une courbe standard une fois par numéro de lot.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6, 7 et 8).

## 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

### 9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

**Tableau 5** : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

**Remarque** : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 6** : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

**Remarque** : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Remarque** : le nombre total de copies par réaction des **Standard A**, **Standard B** et **Standard C** doit être saisi dans le Fichier de configuration du logiciel du thermocycleur de PCR en temps réel. Utiliser un volume total de 5 µl d'ADN pour obtenir les concentrations suivantes :

**Étalon A : 5 x 10<sup>1</sup> copies/réaction**

**Étalon B : 5 x 10<sup>3</sup> copies/réaction**

**Étalon C : 5 x 10<sup>5</sup> copies/réaction**

**Remarque** : la courbe standard peut être incluse sur le thermocycleur de PCR en temps réel pour chaque paramètre. Hormis avec l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad), il est seulement nécessaire d'appliquer la courbe standard une fois par numéro de lot. Lorsque l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le

thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad) sont utilisés, une courbe standard doit être incluse dans chaque analyse. Pour tout autre type de thermocycleur, seul un échantillon de la courbe standard ( Standard B ) doit être inclus dans la configuration expérimentale en tant que calibreur pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel: En règle générale, il est néanmoins recommandé de toujours tester les trois standards à chaque exécution.

### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel RIDA® GENE DNA et ARN sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

Transcription inverse	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
PCR Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 8 : Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™ et Rotor-Gene Q

Transcription inverse	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
PCR Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Remarque : le nombre total de copies par réaction des Standard A, Standard B et Standard C doit être saisi dans le Fichier de configuration du logiciel du thermocycleur de PCR en temps réel.

Utiliser un volume total de 5 µl d'ADN pour obtenir les concentrations suivantes :

Étalon A :  $5 \times 10^1$  copies/réaction

Étalon B :  $5 \times 10^3$  copies/réaction

Étalon C :  $5 \times 10^5$  copies/réaction

Remarque : la courbe standard peut être incluse sur le thermocycleur de PCR en temps réel pour chaque paramètre. Hormis avec l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad), il est seulement nécessaire d'appliquer la courbe standard une fois par numéro de lot. Lorsque l'ABI 7500 (Applied Biosystems) et le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad) sont utilisés, une courbe standard doit être incluse dans chaque analyse. Pour tout autre type de thermocycleur, seul un échantillon de la courbe standard ( Standard B ) doit être inclus dans la configuration expérimentale en tant que calibre pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel. En règle générale, il est néanmoins recommandé de toujours tester les trois standards à chaque exécution.

## 9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	530	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	465/510	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	

## 10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  copies de contrôle positif.

**Tableau 10** : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O * <sup>1</sup>	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

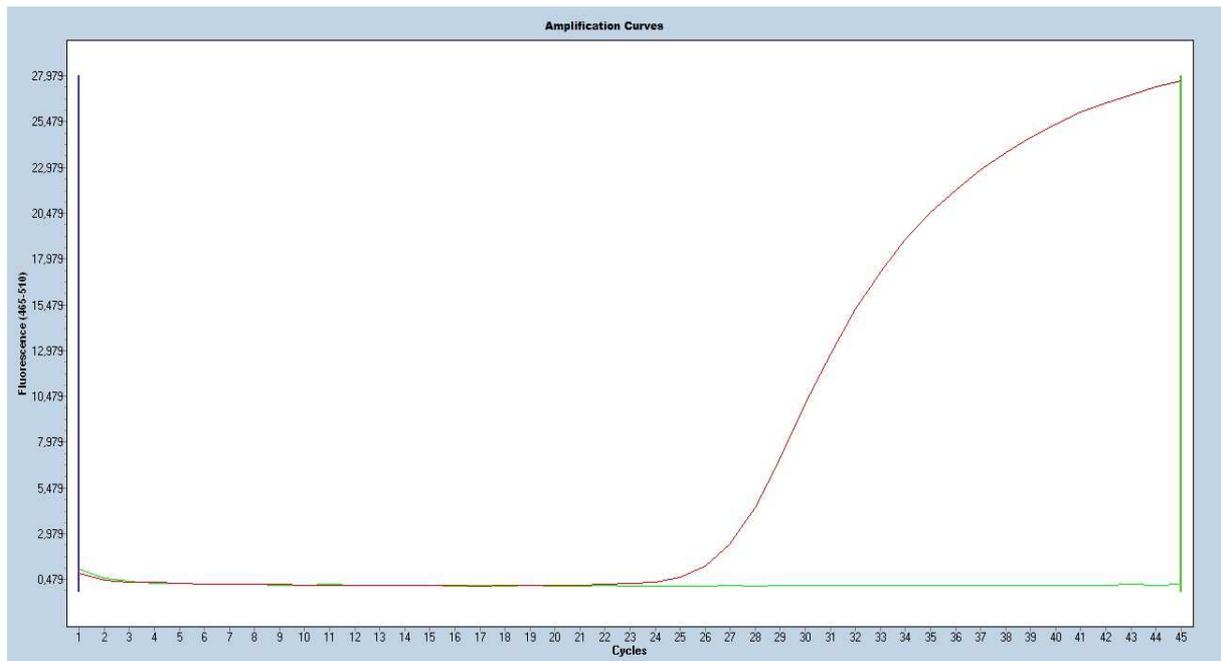
\*<sup>1</sup> Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

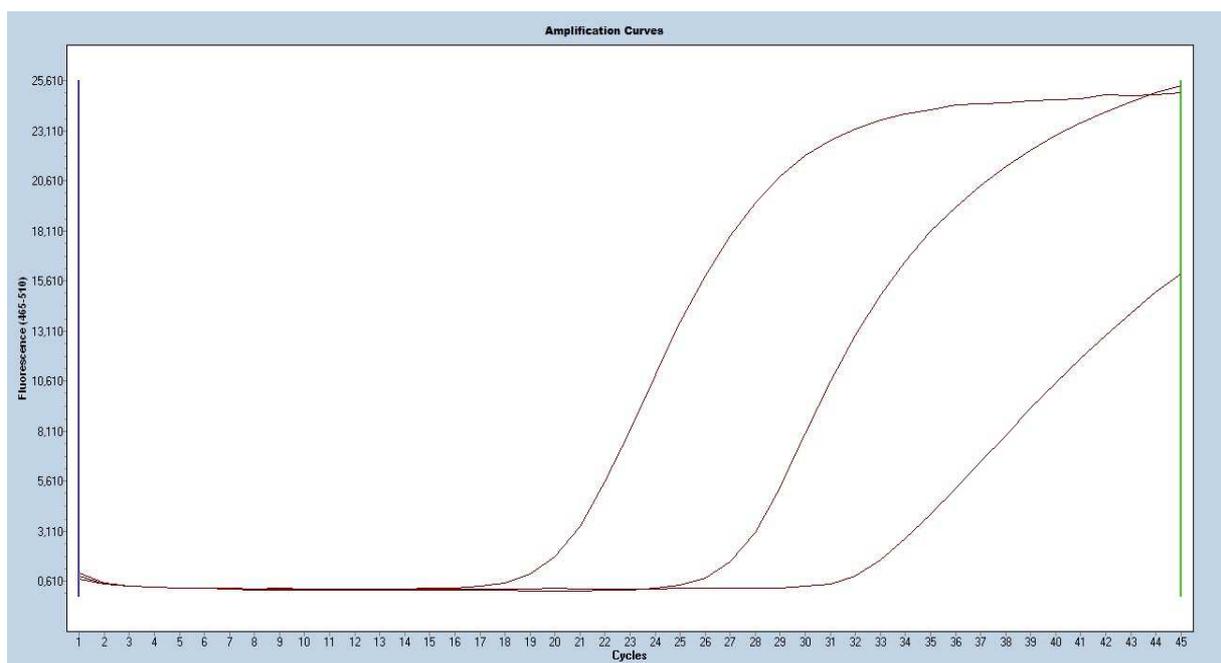
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



**Fig. 1 :** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Pneumocystis jirovecii*) sur le LightCycler® 480II



**Fig. 2 :** Séries standard de *Pneumocystis jirovecii* avec le **Standard A** (10<sup>1</sup> copies d'ADN par µl), **Standard B** (10<sup>3</sup> copies d'ADN par µl) et **Standard C** (10<sup>5</sup> copies d'ADN par µl) sur le LightCycler® 480II

## 10.1 Validité de la détection quantitative

Pour que l'exécution du test de diagnostic quantitatif soit valide, toutes les conditions de contrôle d'une exécution de test de diagnostic quantitatif valide doivent être satisfaites. De plus, pour obtenir des résultats de quantification exacts, il est nécessaire de générer une courbe standard valide. Pour que l'exécution de test de diagnostic quantitatif soit valide, les valeurs suivantes doivent être obtenues pour les paramètres de contrôle de la courbe standard.

	Paramètres de contrôle	Valeur valide
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	Efficiency	1,9 – 2,1
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	Efficiency	1,9 – 2,1
	Slope	-3,1 – -3,6
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	Rsq	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
<b>ABI 7500</b>	R <sup>2</sup>	> 0,98
	Slope	-3,1 – -3,6
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	R <sup>2</sup>	> 0,98
	Slope	-3,1 - -3,6
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	R <sup>2</sup>	> 0,98
	M	3,1 – -3,6

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11** : Interprétation des échantillons

Gènes cibles		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	ICD	Ergebnis
positif	positif/négatif	<i>Pneumocystis jirovecii</i> détecté
négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	Non valide

*Pneumocystis jirovecii* est détecté si l'ADN de l'échantillon et le **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

*Pneumocystis jirovecii* est également détecté si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le **Internal Control DNA**. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent de l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**.

*Pneumocystis jirovecii* n'est pas détecté si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le **Internal Control DNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

### 11.1 Quantification des échantillons

Pour quantifier les échantillons positifs pour *Pneumocystis jirovecii*, il faut effectuer séparément une courbe standard avec les **Standard A**, **Standard B** et **Standard C**. La mesure de la courbe standard doit être enregistrée séparément. Cependant, il est possible d'utiliser la même mesure de courbe standard dans toutes les analyses avec les produits issus d'un même numéro de lot pour importer l'expérimentation enregistrée.

**Remarque : cela ne concerne pas les thermocycleurs suivants : ABI 7500 (Applied Biosystems) et CFX96™ (Bio-Rad). Pour ceux-ci, il faut mesurer une courbe standard pour chaque analyse.**

**Pour tout autre type de thermocycleur, un échantillon de la courbe standard (**Standard B**) doit être inclus dans la configuration**

## expérimentale en tant que calibreur pour chaque nouvelle analyse de PCR en temps réel.

Pour quantifier les échantillons positifs pour *Pneumocystis jirovecii*, tous les échantillons de standard (A, B et C), le contrôle positif et le contrôle négatif, ainsi que les échantillons inconnus à quantifier doivent être sélectionnés et analysés selon les instructions du fabricant du thermocycleur. Les résultats de quantification ne sont corrects et fiables que si les valeurs Ct du gène cible spécifique (mt LSU ; grande sous-unité) de *Pneumocystis jirovecii* peuvent être détectées dans la plage de Ct standard.

Avec le test de PCR en temps réel multiplexe quantitatif RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii, le nombre de copies d'ADN/réaction du paramètre est calculé. La conversion en copies/ml est effectuée à l'aide d'un facteur de correction K et tient compte des dilutions de la procédure d'extraction (en fonction du kit d'extraction utilisé) et de la configuration de la PCR.

La conversion des résultats du test de PCR en temps réel multiplexe quantitatif RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii en copies/ml est calculée en utilisant la formule suivante :

$$C \text{ [copies/ml]} = c \text{ [copies/réaction]} \times K$$

C [copies/ml]	- concentration de l'échantillon en copies/ml d'échantillon
c [copies/réaction]	- concentration d'ADN dans la réaction de PCR (résultat de la PCR quantitative)
K	- facteur de correction

Pour le calcul du facteur de correction, les informations suivantes doivent être prises en compte :

- Dilution de l'échantillon
- Volume initial de l'échantillon pour l'extraction d'ADN
- Extrait d'ADN à partir de l'éluat total utilisé pour la réaction de PCR

**Tableau 12 :** Exemple de calcul du facteur de correction K avec l'appareil Maxwell® RSC (Promega)

Description	Facteur
Échantillon de 300 µl utilisé pour l'extraction*, élué dans un volume final de 60 µl	Aucun facteur
5 µl d'extrait d'ADN utilisé dans la PCR (éluat total de 60 µl = 1/12)	x 12
Échantillon de 300 µl ramené à 1 ml*	x 3,3
Facteur de correction K pour <i>Pneumocystis jirovecii</i>	40

\* Le résultat est basé sur un volume initial de LBA de 1 ml

**Remarque :** Pour en savoir plus sur la quantification des échantillons, veuillez contacter [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA<sup>®</sup> GENE *Pneumocystis jirovecii*.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (mt LSU ; grande sous-unité).

## 13. Performances

### 13.1 Performance clinique

Dans une étude de validation clinique rétrospective, nous avons analysé 203 spécimens extraits (LBA) avec le test RIDA<sup>®</sup> GENE *Pneumocystis jirovecii* et un test de PCR en temps réel interne dans un laboratoire en Allemagne.

**Tableau 13 :** Corrélation des résultats de *Pneumocystis jirovecii* obtenus avec le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE *Pneumocystis jirovecii* et de la PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne		Total	Commentaires
		Positif	Négatif		
RIDA <sup>®</sup> GENE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Positif	28	2 <sup>b)</sup>	30	Corrélation positive : 91,8 %
	Négatif	3 <sup>a)</sup>	170	173	Corrélation négative : 98,6 %
	Total	31	172	203	

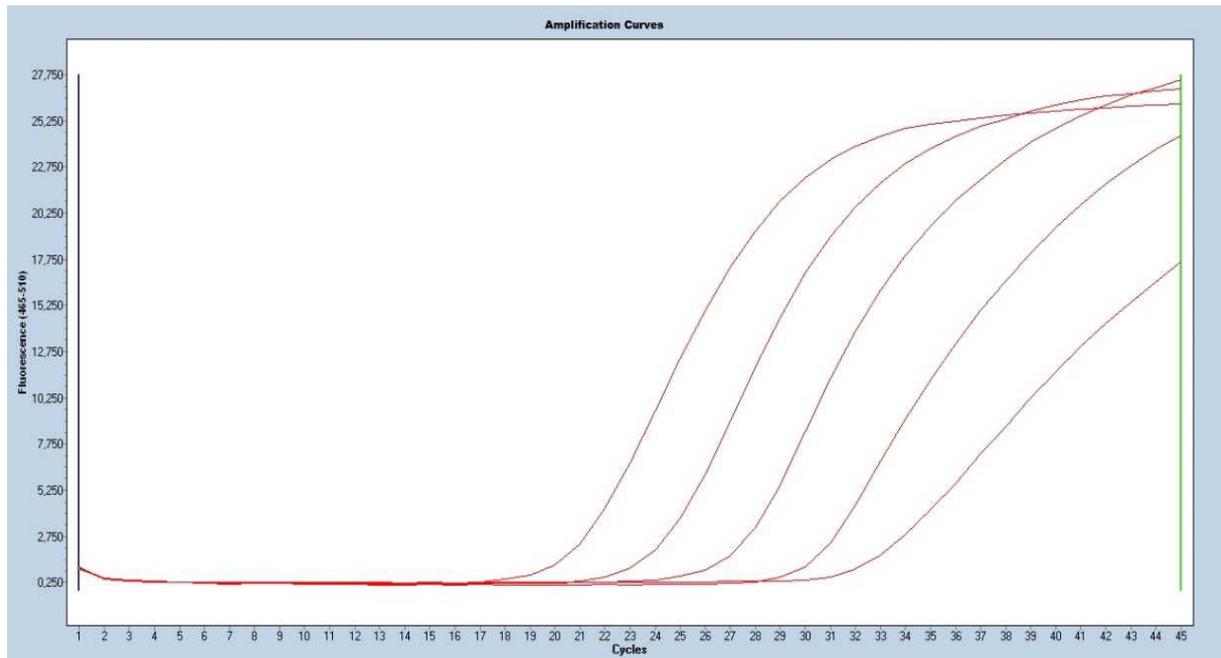
a) Trois (3) échantillons sont sous la limite de détection (LDD) du test RIDA<sup>®</sup> GENE *Pneumocystis jirovecii* avec une valeur  $C_p > 35$  dans le test de PCR en temps réel interne de référence.

b) Deux (2) échantillons sont sous la limite de détection (LDD) du test de PCR en temps réel interne de référence avec une valeur  $C_p > 33$  dans le test RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii*

### 13.2 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii* est  $\geq 10$  copies d'ADN par réaction pour *Pneumocystis jirovecii*.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions de *Pneumocystis jirovecii* ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II.



**Figure 2 :** Série de dilutions pour *Pneumocystis jirovecii* ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

### 13.3 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii est spécifique pour *Pneumocystis jirovecii*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 14, \* détectée par alignement de séquences) :

**Tableau 14** : Test de la réactivité croisée

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Rhizomucor pusillus</i>	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	Coxsackie B4, humain	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	Cytomégalovirus, humain	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Scedosporium apiospermum</i>	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Doratomyces microsporus</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Scedosporium prolificans</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	-	Virus d'Epstein-Barr, souche 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 parainfluenza 1, souche humaine C35	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Helicobacter felis</i>	-	Virus parainfluenza 2, humain, souche Greer	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Virus Herpes simplex 1, souche McIntyre	-	Virus parainfluenza, sérotype 3	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Virus Herpes simplex 2, souche MS	-	Virus parainfluenza 4b, humain, souche CH19503	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	Human Metapneumovirus	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche 9320	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Cladosporium</i> spp	-	Virus de la grippe, infectieux A/PR/8/34	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche Long	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Coronavirus 229E, humain	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Rhinovirus humain, génogroupe A	-	Virus varicelle-zona (type B)	-

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-07-22	4. Contenu du paquet 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9.2 Préparation du mélange pour la PCR 9.3 Configuration de l'instrument de PCR 10. Contrôle qualité

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

### Symboles spécifiques au test

Sans objet

## 16. Bibliographie

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.