

## RIDA® GENE Pneumocystis jirovecii

**REF** PG1905



## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE Pneumocystis jirovecii è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa e quantitativa diretta dello *Pneumocystis jirovecii* in campioni di fluido per il lavaggio broncoalveolare umano (BAL).<sup>1,2</sup>

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE Pneumocystis jirovecii è adatto come ausilio nella diagnosi delle infezioni respiratorie causate da *Pneumocystis jirovecii*.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Lo *Pneumocystis jirovecii* (ex *P. carinii*) appartiene alla famiglia delle *Pneumocystidaceae* e può causare la polmonite interstiziale. Le infezioni opportunistiche sono un problema grave nei pazienti immunocompromessi, tra cui pazienti affetti da HIV/AIDS, pazienti trattati con chemioterapia e pazienti che ricevono un trapianto d'organo. Lo *Pneumocystis jirovecii* provoca infezioni respiratorie ed è causa della malattia opportunistica più comune nei soggetti affetti da HIV. Lo *Pneumocystis jirovecii* non causa alcun danno alle persone sane ed è ampiamente diffuso tra la popolazione normale. Tuttavia, l'infezione da *Pneumocystis jirovecii* in soggetti immunocompromessi causa la polmonite, con sintomi quali tosse secca, respiro corto, tachipnea e febbre.<sup>3</sup> Sebbene la terapia HAART abbia ridotto l'incidenza di *Pneumocystis jirovecii* del 3,4 % all'anno dopo il 1996, si stima che ancora il 9 % dei pazienti affetti da HIV/AIDS ospedalizzati e l'1 % dei riceventi di trapianto d'organo solido contraggano l'infezione.<sup>4</sup> Secondo il CDC (Center for Disease Control), lo *Pneumocystis jirovecii* provoca il 100 % di mortalità in pazienti non trattati e il tasso di mortalità nei soggetti immunocompromessi trattati è del 5-40 %.<sup>4</sup> La mortalità per infezioni da *Pneumocystis jirovecii* in pazienti non affetti da HIV può essere del 40 %.<sup>5</sup> Finora, la rivelazione dello *Pneumocystis jirovecii* è stata eseguita mediante immunofluorescenza. Tuttavia, a causa della bassa sensibilità di detta tecnica, attualmente viene utilizzata la PCR.<sup>2</sup>

## 3. Principio del test

RIDA<sup>®</sup>GENE Pneumocystis jirovecii è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa e quantitativa diretta dello *Pneumocystis jirovecii* in campioni di fluido per il lavaggio broncoalveolare umano (BAL).

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione del frammento genetico (se presente) specifico per lo *Pneumocystis jirovecii* (mt LSU; subunità grande).

I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la

Taq-Polymerase rompe la prossimità tra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la

quantità di ampliconi formati. Con gli standard **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** inclusi nel kit, è possibile quantificare i risultati. Il kit di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii contiene un **Internal Control DNA** (ICD) che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e conferma che l'estrazione dell'acido nucleico è stata sufficiente.

#### 4. Contenuto della confezione

**Tab. 1:** Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu
10 <sup>1</sup>	Standard A	1x	100 µl	blu scuro
10 <sup>3</sup>	Standard B	1x	100 µl	blu scuro
10 <sup>5</sup>	Standard C	1x	100 µl	blu scuro

#### 5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelamento senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

## 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test di PCR real-time multiplex RIDA® GENE Pneumocystis è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

**Tab. 2:** Attrezzatura necessaria

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Nota: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.**

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

### 8.1 Preparazione dei campioni per lavaggio broncoalveolare (BAL)

Per l'isolamento del DNA da campioni per lavaggio broncoalveolare (BAL) utilizzare un kit (ad es. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R. Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Pneumocystis jirovecii contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso, scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Control**, il **No Template Control**, l'**Internal Control DNA** e gli standard **Standard A**, **Standard B** e **Standard C**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

**Tab. 4:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
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>Totale</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

## 9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

**Controllo negativo:** dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Nota:** se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

**Campione:** dispensare 5 µl di estratto di DNA nella Master Mix pre-pipettata.

**Controllo positivo:** dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Nota:** se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

**Standard (A, B, C):** dispensare 5 µl di **Standard** (A, B, C) nella Master Mix pre-pipettata.

**Nota:** se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix degli standard.

**Nota:** l'uso dei seguenti ciclatori richiede di inserire una curva standard ad ogni esecuzione: ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad).

Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso solo un campione della curva standard (**Standard B**) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time. In questi casi, l'applicazione di una curva standard è sufficiente per un'esecuzione per ciascun codice identificativo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab. 8).

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo della PCR real-time per DNA

**Tab. 5:** Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tab. 6:** Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Nota:** occorre digitare il numero totale di copie per reazione di Standard A, Standard B e Standard C nel file di configurazione del software del ciclatore di PCR real time. Viene utilizzato un volume totale di 5 µl di DNA, che determina le seguenti concentrazioni:

**Standard A:  $5 \times 10^1$  copie/reazione**

**Standard B:  $5 \times 10^3$  copie/reazione**

**Standard C:  $5 \times 10^5$  copie/reazione**

**Nota:** per ciascun parametro, è possibile salvare la curva standard sul ciclatore di PCR real-time. Salvo con i ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è necessario eseguire la curva standard una sola volta per ciascun codice identificativo. Con ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è invece necessario inserire una curva standard ad ogni esecuzione. Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso solo un campione della curva standard ( Standard B ) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time. In generale si consiglia comunque di testare sempre tutti e tre gli standard a ogni ciclo.



### 9.3.2 Profilo PCR real-time universale

**Nota:** il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

**Tab. 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tab. 8:** Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, CFX96™ e Rotor-Gene Q

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Nota:** occorre digitare il numero totale di copie per reazione di Standard A, Standard B e Standard C nel file di configurazione del software del ciclatore di PCR real time. Viene utilizzato un volume totale di 5 µl di DNA, che determina le seguenti concentrazioni:

**Standard A:**  $5 \times 10^1$  copie/reazione

**Standard B:**  $5 \times 10^3$  copie/reazione

**Standard C:**  $5 \times 10^5$  copie/reazione

**Nota:** per ciascun parametro, è possibile salvare la curva standard sul ciclatore di PCR real-time. Salvo con i ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è necessario eseguire la curva standard una sola volta per ciascun codice identificativo. Con ciclatori ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad), è invece necessario

inserire una curva standard ad ogni esecuzione. Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso solo un campione della curva standard ( Standard B ) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time. In generale si consiglia comunque di testare sempre tutti e tre gli standard a ogni ciclo.

#### 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 2.0	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	530	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	

## 10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie.

**Tab. 10:** Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA * <sup>1</sup>	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

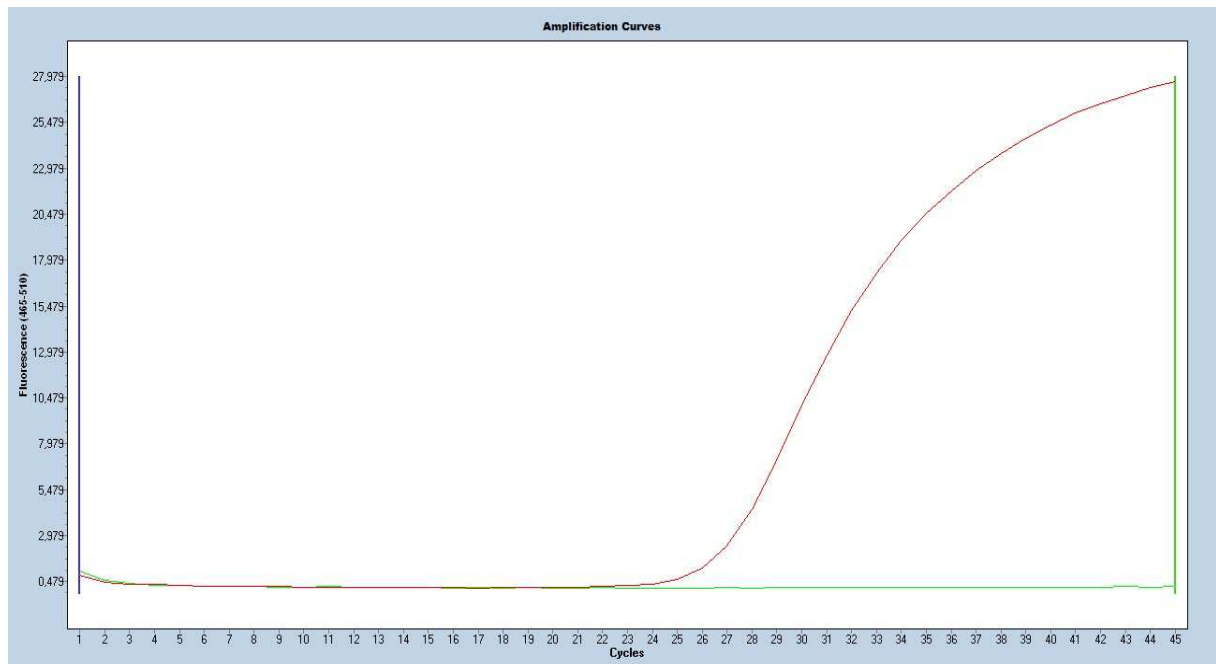
\*<sup>1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

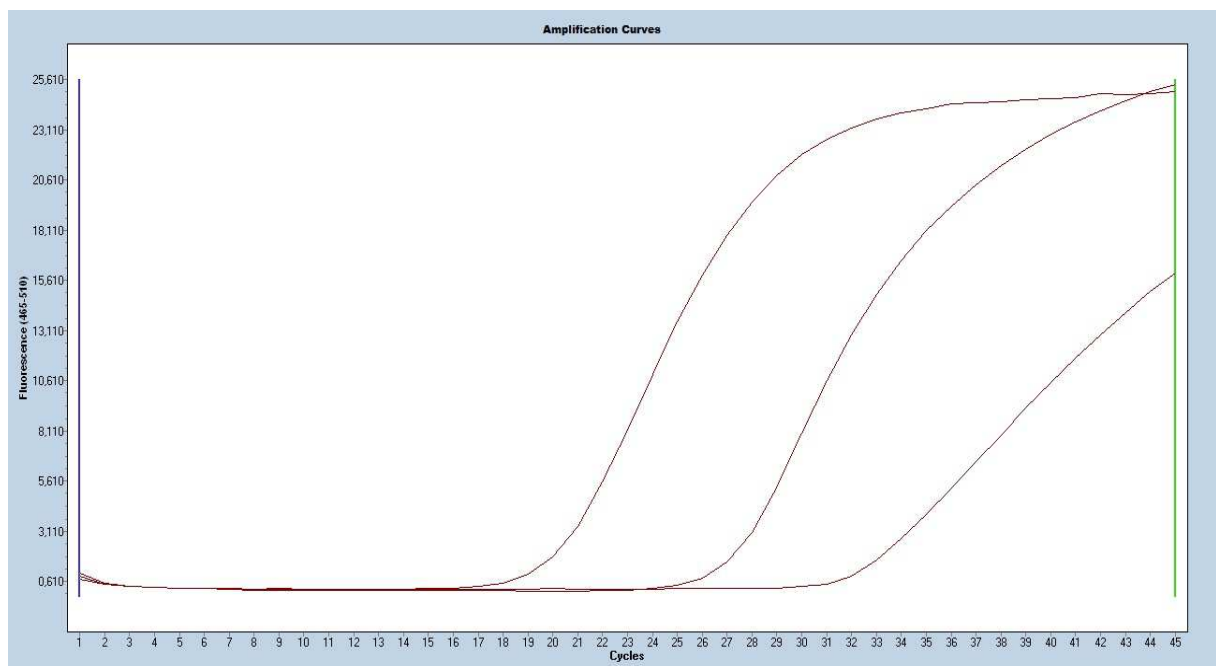
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Fig. 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e negativo (verde) (*Pneumocystis jirovecii*) su LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Serie standard di *Pneumocystis jirovecii* con **Standard A** ( $10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ), **Standard B** ( $10^3$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) e **Standard C**. ( $10^5$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) su LightCycler® 480II

## 10.1 Validità della rivelazione quantitativa

Per la validità dell'esecuzione del test diagnostico quantitativo, occorre che siano soddisfatte tutte le condizioni di controllo applicabili ad un test valido. Per risultati di quantificazione accurati, occorre inoltre generare una curva standard valida. Per l'esecuzione di un test diagnostico quantitativo valido, si devono conseguire i seguenti valori dei parametri di controllo della curva standard.

	Parametro di controllo	Valore valido
<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>	Rs <sub>q</sub>	> 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. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tab. 11:** Interpretazione del campione

Geni target		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	ICD	Risultato
positivo	positivo/negativo	<i>Pneumocystis jirovecii</i> rivelato
negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	Non valido

Viene rivelato *Pneumocystis jirovecii* se sia il DNA del campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

*Pneumocystis jirovecii* è inoltre comprovabile se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione ma nessun segnale per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'**Internal Control DNA** sia debole o assente.

*Pneumocystis jirovecii* non è comprovabile se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione è presente un segnale per l'**Internal Control DNA**. La rivelazione dell'**Internal Control DNA** esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'**Internal Control DNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

### 11.1 Quantificazione dei campioni

Per quantificare i campioni positivi a *Pneumocystis jirovecii*, deve essere eseguita separatamente una curva standard con **Standard A**, **Standard B** e **Standard C**. La misurazione della curva standard deve essere salvata separatamente. Tuttavia, la stessa misurazione della curva standard è utilizzabile in tutte le esecuzioni con prodotti aventi lo stesso codice identificativo importando l'esperimento salvato.

**Nota: questo non è valido per i seguenti ciclatori: ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad). In questi casi, deve essere misurata una curva standard a ogni esecuzione.**

**Per tutti gli altri ciclatori, nell'impostazione sperimentale come calibratore deve essere incluso un campione della curva standard (**Standard B**) per ogni nuova esecuzione di PCR real-time.**

Per quantificare i campioni positivi a *Pneumocystis jirovecii*, tutti i campioni standard (A, B e C), il controllo positivo e negativo, e i campioni non noti da quantificare, devono essere selezionati e analizzati in base alle istruzioni del produttore del ciclatore. I risultati di quantificazione corretti sono affidabili solo se all'interno del range Ct standard è possibile rivelare valori Ct del gene target specifico per *Pneumocystis jirovecii* (mt LSU; subunità grande).

Con il kit di PCR real-time multiplex quantitativa RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii viene calcolata la quantità di DNA del parametro in copie/reazione. La conversione in copie/ml viene eseguita con un fattore K di correzione e tiene conto delle diluizioni durante la procedura di estrazione (che dipendono dal kit di estrazione utilizzato) e dell'impostazione della PCR.

La conversione del risultato del test quantitativo di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii in copie/ml è calcolata con la seguente formula:

$$C \text{ [copie/ml]} = c \text{ [copie/reazione]} \times K$$

- C [copie/ml] - concentrazione di campione nel campione in copie/ml  
 c [copie/reazione] - concentrazione di DNA nella reazione PCR (risultato della PCR quantitativa)  
 K - fattore di correzione

Per il calcolo del fattore di correzione, considerare le seguenti informazioni:

- Diluizione del campione
- Volume iniziale del campione per l'estrazione del DNA
- Estratto di DNA dall'eluato totale utilizzato per la reazione PCR

**Tab. 12:** Esempio di calcolo del fattore di correzione K con il sistema Maxwell® RSC (Promega)

Descrizione	Fattore
300 µl di campione inserito nell'estrazione*, eluito in 60 µl di volume finale	Nessun fattore
5 µl di DNA estratto inserito nella PCR (eluato totale 60 µl = 1/12)	x 12
300 µl di campione scalato a 1 ml*	x 3,3
Fattore di correzione K per <i>Pneumocystis jirovecii</i>	40

\* Il risultato è basato su 1 ml di materiale iniziale BAL

**Nota:** per ulteriori informazioni sulla quantificazione dei campioni contattare [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per il fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL).
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti con il test RIDA<sup>®</sup>GENE *Pneumocystis jirovecii* e causare un falso negativo.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni target ((mt LSU; subunità grande).

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Prestazioni cliniche

In uno studio di validazione clinica retrospettiva condotto presso un laboratorio in Germania abbiamo analizzato 203 campioni estratti (BAL) con il test RIDA<sup>®</sup>GENE *Pneumocystis jirovecii* e con un test di PCR real-time interno.

**Tab. 13:** Confronto tra i risultati relativi allo *Pneumocystis jirovecii* con PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE *Pneumocystis jirovecii* e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno		Totale	Commenti
		Positivo	Negativo		
RIDA <sup>®</sup> GENE <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Positivo	28	2 <sup>b)</sup>	30	Concordanza pos.: 91,8 %
	Negativo	3 <sup>a)</sup>	170	173	Concordanza neg.: 98,6 %
	Totale	31	172	203	

a) Tre (3) campioni sono inferiori al limite di rivelazione (LOD) del test RIDA<sup>®</sup>GENE *Pneumocystis jirovecii*, con un valore di  $C_p > 35$  nel test di PCR real-time interno di riferimento.

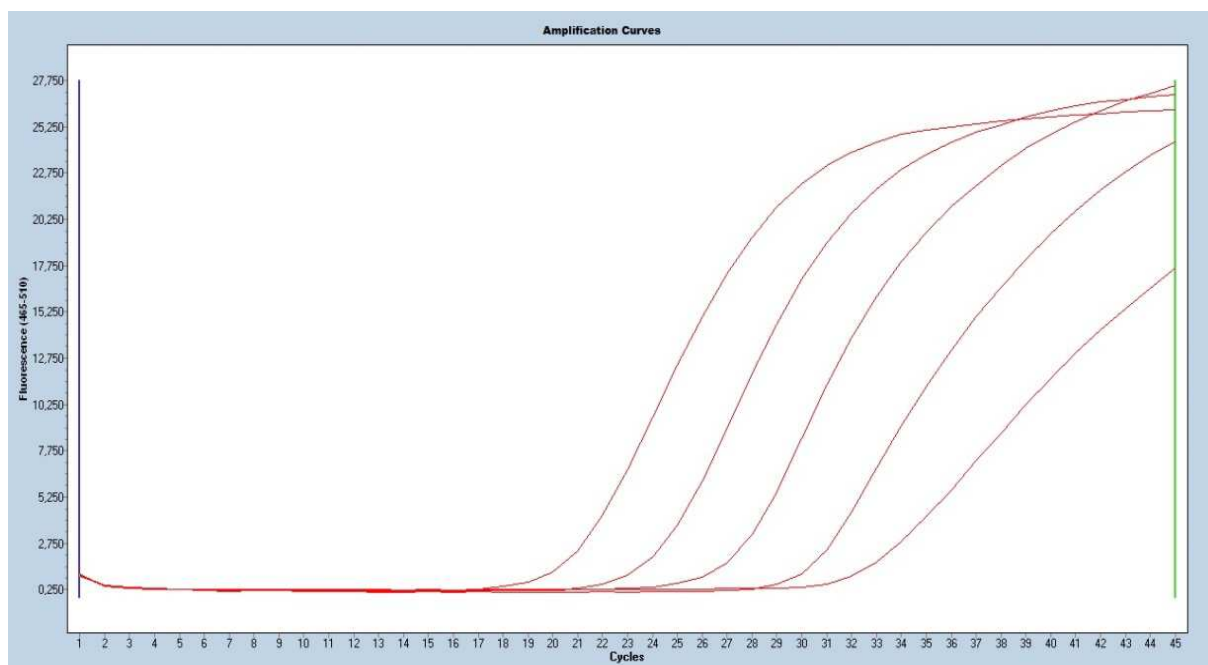
b) Due (2) campioni sono inferiori al limite di rivelazione (LOD) del test di PCR real-time interno di riferimento, con un valore di  $C_p > 33$  nel test RIDA<sup>®</sup>GENE *Pneumocystis jirovecii*.



## 13.2 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE *Pneumocystis jirovecii* ha un limite di rivelazione  $\geq 10$  copie di DNA per reazione per lo *Pneumocystis jirovecii*.

La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di *Pneumocystis jirovecii* ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) su LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Fig. 2:** Serie di diluizioni di *Pneumocystis jirovecii* ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) su LightCycler<sup>®</sup> 480II

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

### 13.3 Specificità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE *Pneumocystis jirovecii* è specifico per *Pneumocystis jirovecii*. Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 14, \* rivelazione con allineamento di sequenze):

**Tab. 14:** Test di reattività crociata










<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Rhizomucor pusillus</i>	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	Coxsackie B4, umano	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	Cytomegalovirus, umano	-	<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Scedosporium apiospermum</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Doratomyces microsporus</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Scedosporium prolificans</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	-	Virus Epstein-Barr, ceppo 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 parainfluenzale umano 1, ceppo C35	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Helicobacter felis</i>	-	Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	-	<i>Staphylococcus hominis</i> , sottosp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	-	Virus parainfluenzale umano 4b, ceppo CH19503	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Metapneumovirus umano</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Cladosporium</i> spp	-	Virus dell'influenza A/PR/8/34	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Coronavirus 229E, umano	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Rhinovirus umano, genogruppo A	-	Virus Varicella Zoster (tipo B)	-

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-07-22	4. Contenuto della confezione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9.2 Preparazione della PCR Mix 9.3 Impostazione dello strumento per PCR 10. Controllo qualità

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

### Simboli specifici nel test

Non pertinente

## 16. Bibliografia

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.