

## RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii*

**REF** PG1905



## 1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in-vitro*. RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii é uma PCR em tempo real multiplex para a detecção direta qualitativa e quantitativa de *Pneumocystis jirovecii* de lavado broncoalveolar (BAL) humano.<sup>1,2</sup>

A PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii destina-se ao uso como auxílio em diagnósticos de infecções respiratórias causadas por *Pneumocystis jirovecii*.

## 2. Sumário e explicação do teste

O *Pneumocystis jirovecii* (antigo *P. carinii*) pertence à família de *Pneumocystidaceae* e pode levar a uma pneumonia intersticial. Infecções oportunistas são um importante problema em pacientes com sistema imunológico comprometido, por exemplo pacientes com HIV/AIDS, pacientes com tratamento quimioterápico e aqueles que recebem transplante de órgãos. O *Pneumocystis jirovecii* provoca infecções respiratórias e é a doença oportunista mais comum em pessoas infectadas com HIV. O *Pneumocystis jirovecii* não causa nenhum problema em pessoas saudáveis e está amplamente disseminado entre a população normal. No entanto, pessoas com sistema imunológico comprometido infectadas com *Pneumocystis jirovecii* desenvolvem pneumonia com sintomas que incluem tosse seca, falta de ar, taquipneia e febre.<sup>3</sup> Embora a terapia de HAART tenha diminuído a incidência de *Pneumocystis jirovecii* em 3,4 % por ano depois de 1996, é estimado que 9 % dos pacientes hospitalizados por HIV/AIDS e 1 % dos pacientes que receberam transplante de órgão sólido ainda são infectados.<sup>4</sup> De acordo com o Centro de controle de doenças (CDC), o *Pneumocystis jirovecii* causa 100 % de mortalidade em pacientes sem tratamento e uma taxa de mortalidade em pacientes com sistema imunológico comprometido de 5% a 40 % em pacientes tratados.<sup>4</sup> A mortalidade por *Pneumocystis jirovecii* em pacientes não infectados com HIV pode ser de até 40 %.<sup>5</sup> Até agora, a detecção de *Pneumocystis jirovecii* era feita por imunofluorescência. No entanto, devido à sua baixa sensibilidade, agora ela é substituída pela PCR.<sup>2</sup>

## 3. Princípio do teste

O RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii é uma PCR em tempo real multiplex para a detecção direta qualitativa e quantitativa de *Pneumocystis jirovecii* de lavado broncoalveolar (BAL) humano.

Depois do isolamento do DNA, ocorre a ampliação do fragmento do gene específico (se presente) para *Pneumocystis jirovecii* (mt LSU; subunidade grande). Os alvos amplificados são detectados com sondas de hidrólise, que estão marcadas em uma extremidade com um supressor e na outra extremidade com um corante repórter fluorescente (fluoróforo). Na presença de um alvo, as sondas hibridizam para os fragmentos amplificados. Durante a fase de extensão, a Taq-polymerase quebra a

proximidade entre o repórter e o supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. Com os padrões, **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** incluídos no kit, é possível quantificar os resultados. O kit de PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii contém um **Internal Control DNA** (ICD), que detecta a inibição de PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente.

#### 4. Reagentes fornecidos

**Tab. 1:** Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarelo
2	Taq-polimerase	1x	80 µl	vermelho
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	laranja
N	No Template Control	1x	450 µl	branco
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul
10 <sup>^1</sup>	Standard A	1x	100 µl	Azul escuro
10 <sup>^3</sup>	Standard B	1x	100 µl	Azul escuro
10 <sup>^5</sup>	Standard C	1x	100 µl	Azul escuro

#### 5. Instruções de armazenamento

- Proteja todos os reagentes da luz e armazene a -20 °C. Todos os reagentes podem ser usados até ao fim do prazo de validade. Depois de vencido o prazo, a garantia da qualidade já não é válida.
- Descongele cuidadosamente os reagentes antes de usar (por ex., em um frigorífico a 2 – 8 °C).
- Os reagentes podem sustentar até 20 ciclos de congelamento sem influenciar o desempenho do teste (por ex., após o primeiro descongelamento, separe-os em alíquotas e congele-os imediatamente).
- Durante a preparação da PCR, todos os reagentes devem ser conservados a frio de forma adequada (2 a 8 °C).

## 6. Reagentes adicionais e equipamentos necessários

O teste de PCR em tempo real multiplex RIDA® GENE Pneumocystis é adequado para ser usado com as seguintes plataformas de extração e instrumentos de PCR em tempo real:

**Tab. 2:** Equipamento necessário

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

**Indicação: No Rotor-Gene Q (QIAGEN), use apenas tubos de 0,1 ml.**

Se quiser usar outras plataformas de extração ou instrumentos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm em [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para ser usado com o LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para ser usado com o LightCycler® 480II
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos, película)
- Centrífuga com um rotor para tubos de ensaio
- Vortexer
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Ponteiras de filtro
- Luvas descartáveis sem pó
- Água PCR (livre de nuclease)

## 7. Medidas preventivas

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções de realização do teste deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com membranas mucosas ou pele com hematoma. Durante o manuseio de reagentes ou amostras, vista roupa de segurança adequada (luvas, avental de laboratório e óculos de segurança

apropriados), e lave as mãos após concluir a realização do teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes estiverem sendo usados.

- A extração, a preparação da PCR e a execução da PCR devem ser separadas em salas diferentes para evitar contaminações cruzadas.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas, bem como todos os reagentes e materiais expostos às amostras, devendo ser manuseados conforme os regulamentos nacionais de segurança.
- Não use o kit após o prazo de validade.

Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) em [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Coleta e armazenamento de amostras

### 8.1 Preparação da amostra da lavagem broncoalveolar (LBA)

Para isolamento de DNA da lavagem broncoalveolar (BAL), use o kit de isolamento de DNA disponível (por ex., RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de DNA (por ex. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Extraia o DNA de acordo com as instruções do fabricante.

O teste RIDA<sup>®</sup>GENE Pneumocystis jirovecii contém um **Internal Control DNA**, que detecta a inibição de PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente. O **Internal Control DNA** pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o **Internal Control DNA** for usado apenas como controle de inibição de PCR, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control DNA** à mistura principal (consulte a Tab.4).

Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, durante o procedimento de extração, devem ser adicionados 20 µl do **Internal Control DNA**. O **Internal Control DNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente à amostra. Recomendamos também adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle negativo e positivo.

## 9. Realização do teste

### 9.1 Preparação da mistura principal

Calcule o número total de reações PCR (reações de amostra e de controle) necessárias. Em cada ensaio realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

É recomendado calcular um volume adicional de 10 % para compensar pipetagens imprecisas (ver Tab. 3. Tab. 4). Antes de usar, misture cuidadosamente e centrifugue brevemente a mistura [Reaction Mix], a [Taq-Polymerase], o [Positive Control], o [No Template Control], e [Internal Control DNA] e [Standard A], [Standard B] e [Standard C]. Mantenha os reagentes frios o suficiente durante a etapa (2 a 8 °C).

**Tab. 3:** Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD como extração e controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
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>

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

**Tab. 4:** Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD apenas como controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (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>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

## 9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (tubo ou placa).

**Controle negativo:** Adicione 5 µl de **No Template Control** à mistura principal pré-pipetada.

**Indicação:** Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle negativo.

**Amostra:** Adicione 5 µl de extrato de DNA à mistura principal pré-pipetada.

**Controle positivo:** Adicione 5 µl **Positive Control** à mistura principal pré pipetada.

**Indicação:** Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle positivo.

**Padrão (A, B, C):** Adicione 5 µl **Standard** (A,B,C) à mistura principal pré pipetada.

**Indicação:** Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR dos padrões.

**Indicação:** A utilização dos cicladores a seguir exige incluir uma curva padrão em cada execução: ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad).

Para todos os outros cicladores, apenas uma amostra de curva padrão (**Standard B**) deve ser incluída na preparação experimental como calibrador para cada execução de PCR em tempo real. Aqui, a aplicação de uma curva padrão é exigida apenas para uma execução por número de lote.

Cubra os tubos ou a placa. Centrifugue e coloque no instrumento de PCR em tempo real. A reação de PCR deve ser iniciada de acordo com as definições do instrumento de PCR (consulte Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

## 9.3 Configuração do instrumento de PCR

### 9.3.1 Perfil de PCR em tempo real do DNA

**Tab. 5:** Perfil de PCR em tempo real do DNA para LightCycler® series e Rotor-Gene Q

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

**Indicação:** O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

**Tab. 6:** Perfil de PCR em tempo real de DNA para Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

**Indicação:** O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

**Indicação:** O número total de cópias por reação do **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** deve ser inserido no arquivo de configuração do programa de software do ciclador de PCR em tempo real respectivo. Um volume total de 5 µl de DNA é usado, resultando nas seguintes concentrações:

**Standard A:** 5 x 10<sup>1</sup> cópias/reação

**Standard B:** 5 x 10<sup>3</sup> cópias/reação

**Standard C:** 5 x 10<sup>5</sup> cópias/reação

**Indicação:** A curva padrão pode ser salva no ciclador de PCR em tempo real para cada parâmetro. Além dos cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) e do CFX96™ (Bio-Rad), a curva padrão é necessária para uma única execução por número de lote. A utilização dos cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad) exige incluir uma curva padrão em cada execução. Para todos os outros cicladores, apenas uma amostra de curva padrão (**Standard B**) deve ser incluída na preparação experimental como



**calibrador para cada execução de PCR em tempo real. A recomendação geral é, no entanto, testar sempre os três padrões a cada execução.**

### **9.3.2 Perfil de PCR em tempo real universal**

**Indicação:** O perfil de PCR em tempo real universal deve ser utilizado apenas em testes de DNA quando houver a combinação dos testes RIDA® GENE DNA e PCR em tempo real de RNA em uma execução.

**Tab. 7:** Perfil de PCR em tempo real universal para LightCycler® series

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

**Indicação:** O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

**Tab. 8:** Perfil de PCR em tempo real universal para Mx3005P, ABI7500, CFX96™ e Rotor-Gene Q

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

**Indicação:** O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

**Indicação:** O número total de cópias por reação do **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** deve ser inserido no arquivo de configuração do programa de software do cicladador de PCR em tempo real respectivo. Um volume total de 5 µl de DNA é usado, resultando nas seguintes concentrações:

**Standard A:** 5 x 10<sup>1</sup> cópias/reação

**Standard B:** 5 x 10<sup>3</sup> cópias/reação

**Standard C:** 5 x 10<sup>5</sup> cópias/reação

**Indicação:** A curva padrão pode ser salva no ciclador de PCR em tempo real para cada parâmetro. Além dos cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) e do CFX96™ (Bio-Rad), a curva padrão é necessária para uma única execução por número de lote. A utilização dos cicladores ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad) exige incluir uma curva padrão em cada execução. Para todos os outros cicladores, apenas uma amostra de curva padrão (Standard B) deve ser incluída na preparação experimental como calibrador para cada execução de PCR em tempo real. A recomendação geral é, no entanto, testar sempre os três padrões a cada execução.

#### 9.4 Configuração dos canais de detecção

Tab. 9: Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Indicação
Roche LightCycler® 2.0	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	530	É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	465/510	É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Verificar se não é corante de referência
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Verifique se a opção de referência passiva ROX está em nenhum
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Verde	As configurações de ganho devem ser definidas em 5 de acordo com as configurações padrão
	ICD	Amarelo	

## 10. Controle de qualidade

A análise das amostras é realizada pelo software do instrumento de PCR em tempo real usado, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles positivo e negativo devem mostrar resultados corretos (veja a Tabela 10, Fig. 1) para poder determinar uma execução válida.

O **Positive Control** tem uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu$ l. Em cada execução da PCR, ele é usado em um valor total de  $5 \times 10^3$  cópias.

**Tab. 10:** Para uma execução válida, é necessário preencher as seguintes condições:

Amostra	Resultado do ensaio	ICD Ct	Ct Alvo
Controle positivo	Positivo	NA <sup>*1</sup>	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

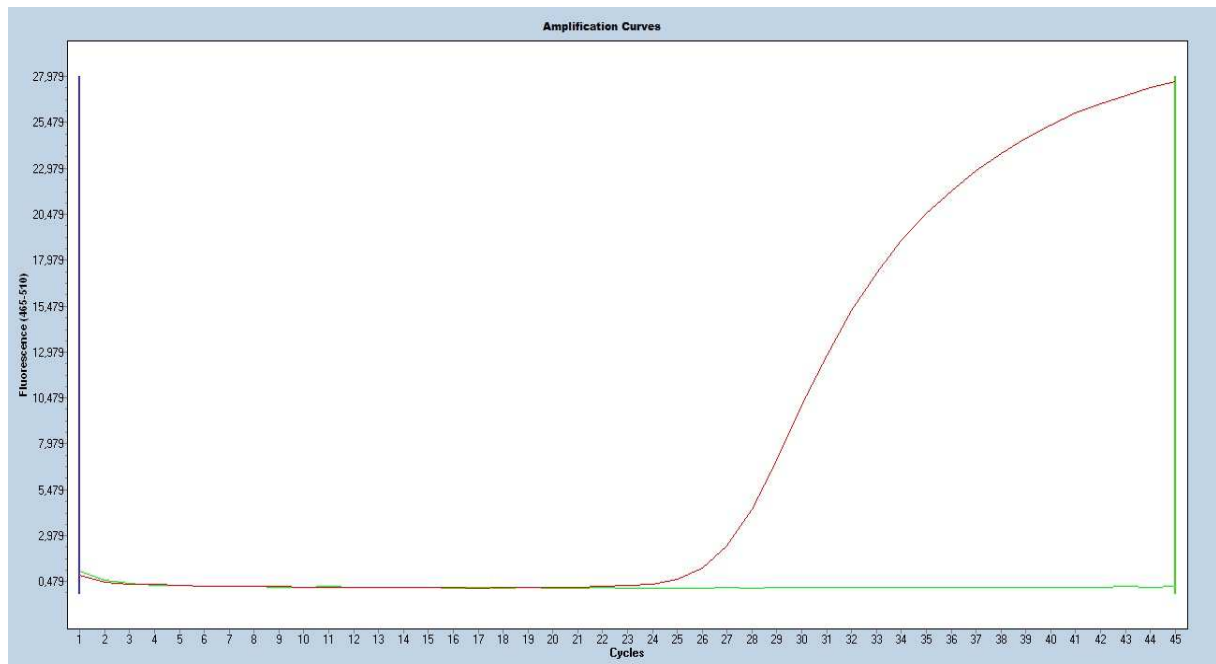
<sup>\*1</sup> Não é necessário um valor de Ct para o ICD para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não for positivo dentro do intervalo de Ct especificado, mas o Controle negativo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

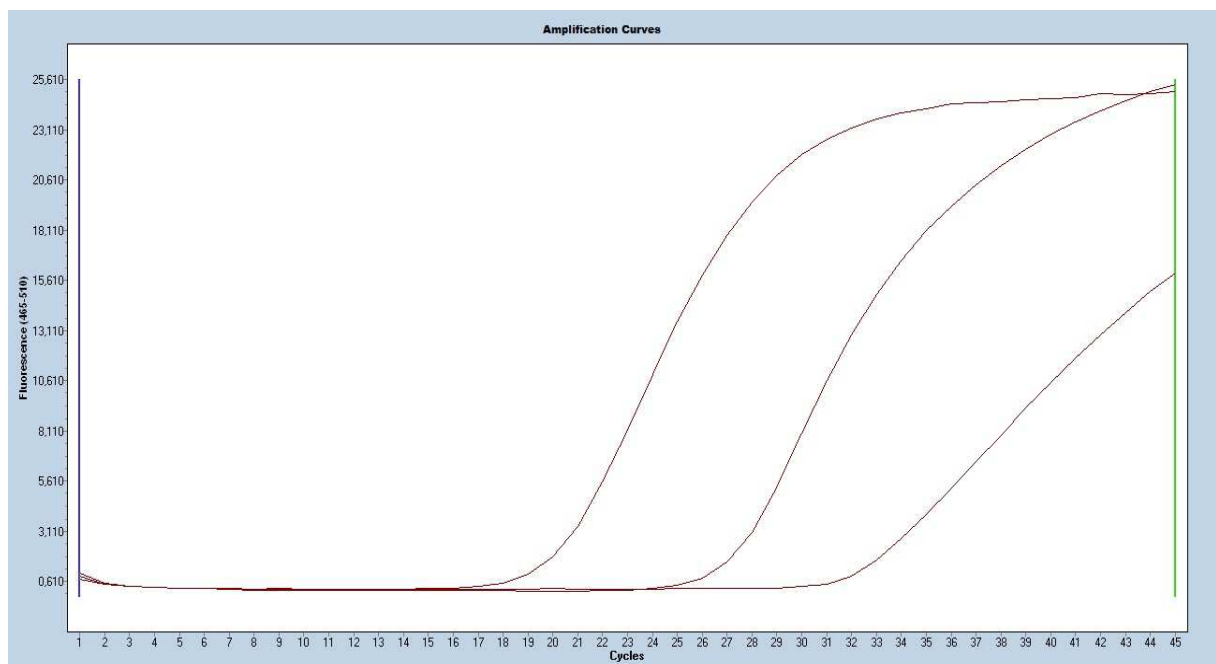
Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se os critérios exigidos não forem preenchidos, os itens a seguir devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade da instrumentação utilizada
- Desempenho correto de realização do teste



**Fig. 1:** Execução correta do controle positivo (vermelho) e controle negativo (verde) (*Pneumocystis jirovecii*) no LightCycler® 480II



**Fig. 2:** *Pneumocystis jirovecii* série padrão com **Standard A** ( $10^1$  cópias de DNA por  $\mu\text{l}$ ), **Standard B** ( $10^3$  cópias de DNA por  $\mu\text{l}$ ) e **Standard C** ( $10^5$  cópias de DNA por  $\mu\text{l}$ ) no LightCycler® 480II

### 10.1 Validade da detecção quantitativa

Para a validade de uma execução de teste de diagnóstico quantitativo, todas as condições de um teste de diagnóstico qualitativo válido devem ser cumpridas. Além disso, para resultados precisos de quantificação, deve ser gerada uma curva padrão válida. Para uma execução de teste de diagnóstico quantitativo válida, devem ser obtidos os seguintes valores de parâmetros de controle da curva padrão.

	<b>Parâmetro de controle</b>	<b>Valor válido</b>
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	Eficiência	1,9 – 2,1
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	Eficiência	1,9 – 2,1
	Inclinação	-3,1 – -3,6
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	Rsq	> 0.98
	Inclinação	-3,1 – -3,6
<b>ABI 7500</b>	R <sup>2</sup>	> 0.98
	Inclinação	-3,1 – -3,6
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	R <sup>2</sup>	> 0.98
	Inclinação	-3,1 – -3,6
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	R <sup>2</sup>	> 0.98
	M	-3,1 – -3,6

## 11. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 11.

**Tab. 11:** Interpretação das amostras

Genes alvo		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	ICD	Ergebnis
positivo	positivo/negativo	<i>Pneumocystis jirovecii</i> detectado
negativo	positivo	Genes alvo não detectados
negativo	negativo	Inválido

O *Pneumocystis jirovecii* é detectado se a amostra de DNA e o **Internal Control DNA** apresentarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

O *Pneumocystis jirovecii* também é detectado se a amostra de DNA apresentar um sinal de amplificação, mas nenhum no **Internal Control DNA** no sistema de detecção. A detecção do controle de amplificação interno não é necessária, porque as altas concentrações do fragmento amplificado podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control DNA**.

O *Pneumocystis jirovecii* não é detectado se a amostra de DNA não apresentar um sinal de amplificação, mas sim um sinal de amplificação no **Internal Control DNA** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção no **Internal Control DNA**.

Uma amostra é inválida, se a amostra de DNA e o **Internal Control DNA** não apresentarem nenhum sinal de amplificação no sistema de detecção. A amostra contém um inibidor de PCR. A amostra extraída precisa ser diluída adicionalmente com água PCR (1:10) e reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

### 11.1 Quantificação de amostras

Para quantificar amostras positivas de *Pneumocystis jirovecii*, é necessário executar uma curva padrão com **Standard A**, **Standard B** e **Standard C** separadamente. A medição da curva padrão deve ser salva separadamente. Porém, importando o experimento salvo, a mesma medição da curva padrão pode ser usada em todas as execuções com produtos com o mesmo número de lote.

**Indicação: Isto não é válido para os seguintes cicladores: ABI 7500 (Applied Biosystems) e CFX96™ (Bio-Rad). Neste caso, a curva padrão deve ser medida com cada execução.**

**Para todos os outros cicladores, uma amostra da curva padrão (Standard B) deve ser incluída na preparação experimental como calibrador para cada execução de PCR em tempo real.**

Para quantificar amostras positivas de *Pneumocystis jirovecii*, todas as amostras padrão (A, B e C), o controle positivo e o negativo, bem como as amostras desconhecidas devem ser quantificados, selecionados e analisados de acordo com as instruções do fabricante do ciclador. Os resultados de quantificação corretos são confiáveis apenas se os valores Ct do gene alvo específico do *Pneumocystis jirovecii* (mt LSU, subunidade grande) puderem ser detectados dentro do intervalo Ct padrão.

Com a PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii*, é calculada a quantidade de DNA em cópias/reação do parâmetro. A conversão em cópias/ml é feita com o fator de correção K e considera as diluições do procedimento de extração (dependendo do kit de extração usado) e a configuração da PCR.

A conversão do resultado da PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE *Pneumocystis jirovecii* quantitativa em cópias/ml é calculada usando a seguinte fórmula:

$$C \text{ [cópias/ml]} = c \text{ [cópias/reação]} \times K$$

- C [cópias/ml] - concentração da amostra em cópias/ml por amostra  
 c [cópias/reação] - concentração de DNA na reação PCR (resultado da PCR quantitativa)  
 K - fator de correção

Para calcular o fator de correção, é necessário levar as seguintes informações em consideração:

- Diluição da amostra
- Volume inicial da amostra para extração de DNA
- Extração de DNA do eluado total usado para a reação PCR

**Tab. 12:** Exemplo de cálculo do fator de correção K usando o Maxwell® RSC (Promega)

Descrição	Fator
300 µl de amostra colocada na extração*, eluída em 60 µl de volume final	Sem fator
5 µl de extração de DNA colocados na PCR (60 µl de eluado total =1/12)	X 12
300 µl de amostra escalados a 1 ml*	X 3.3
Fator de correção K para <i>Pneumocystis jirovecii</i>	40

\* O resultado baseia-se em 1 ml de material inicial BAL

**Indicação:** Para maiores informações sobre a quantificação de amostras, entre em contato pelo e-mail [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 12. Limitações do método

1. O resultado da análise molecular não deve levar ao diagnóstico, mas sim ser sempre considerado no contexto do histórico médico e dos sintomas do paciente.
2. Este teste é validado apenas para zaragatoas e lavados nasofaríngeos em humanos (BAL).
3. A coleta, o transporte, o armazenamento e o processamento inadequados da amostra ou uma carga patogênica na amostra inferior à sensibilidade analítica podem resultar em resultados falso negativos.
4. A presença de inibidores de PCR pode causar resultados inválidos.
5. Mutações ou polimorfismos na primeira coleta ou regiões de ligação de sonda podem afetar a detecção de novas variantes, acarretando em um resultado falso negativo com o teste RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii.
6. Do mesmo modo que em todos os testes de diagnóstico *in vitro* com base em PCR, é possível detectar os níveis de alvo extremamente baixos, inferiores ao limite de detecção (LoD), mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
7. Um resultado positivo dos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Contudo, um resultado positivo é indicativo da presença de genes alvo (mt LSU; subunidade grande).

## 13. Características de desempenho

### 13.1 Desempenho clínico

Em um estudo clínico de validação retrospectiva, analisamos 203 espécimes (BAL) com o teste RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii e um teste de PCR em tempo real interna em um laboratório na Alemanha.

**Tab. 13:** Correlação dos resultados de *Pneumocystis jirovecii* com PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii e PCR em tempo real interna.

		PCR em tempo real interna		Total	Comentários
		Positivo	Negativo		
RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii	Positivo	28	2 <sup>b)</sup>	30	Acordo pos.: 91,8 %
	Negativo	3 <sup>a)</sup>	170	173	Acordo neg: 98,6 %
	Total	31	172	203	

a) Três (3) amostras estão abaixo do limite de detecção (LOD) do teste RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii com um valor de  $C_p > 35$  no teste de referência de PCR em tempo real interna.

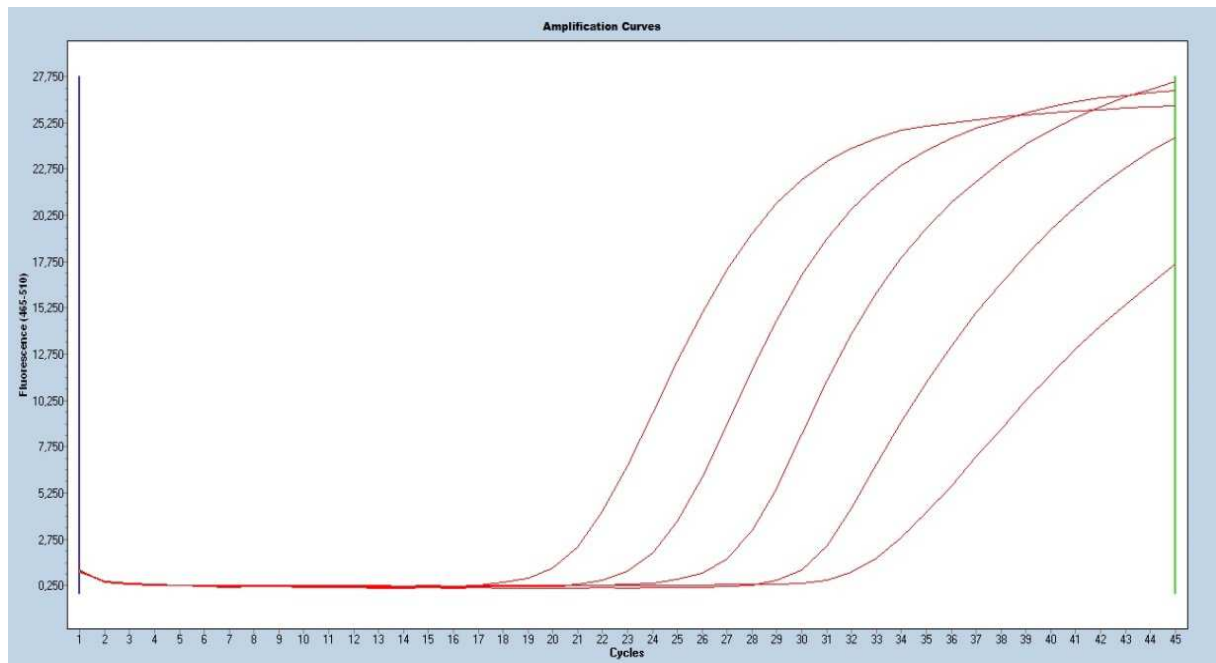
b) Duas (2) amostras estão abaixo do limite de detecção (LOD) do teste de referência de PCR em tempo real interna com um valor de  $C_p > 33$  no teste RIDA®GENE Pneumocystis jirovecii



### 13.2 Sensibilidade analítica

A PCR em tempo real multiplex RIDA® GENE *Pneumocystis jirovecii* tem um limite de detecção de  $\geq 10$  cópias de DNA por reação para *Pneumocystis jirovecii*.

A seguinte figura 2 mostra uma série de diluição do *Pneumocystis jirovecii* ( $10^5 - 10^1$  cópias de DNA por  $\mu\text{l}$ ) no LightCycler® 480II.



**Fig. 2:** Séries de diluição de *Pneumocystis jirovecii* ( $10^5 - 10^1$  cópias de DNA por  $\mu\text{l}$ ) no LightCycler® 480II

O limite de detecção de todo o procedimento depende da matriz da amostra, da extração de DNA e da concentração de DNA.

### 13.3 Especificidade analítica

A PCR em tempo real multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE *Pneumocystis jirovecii* é específica para *Pneumocystis jirovecii*. Não foi detectada nenhuma reação cruzada em relação às seguintes espécies (ver Tab. 14, \* detectado com alinhamento sequencial):

**Tab. 14:** Testes de reatividade 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>	-
Adenovírus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	Cytomegalovirus, humano	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Scedosporium apiospermum</i>	-
Adenovírus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Doratomyces microsporus</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Scedosporium prolificans</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	-	Epstein-Barr-Virus, 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	-	Vírus parainfluenza 1, humano cepa C35	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Helicobacter felis</i>	-	Vírus parainfluenza 2, humano, cepa Greer	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Vírus Herpes simplex 1, cepa McIntyre	-	Vírus parainfluenza sorotipo 3	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Vírus herpes simplex 2, cepa MS	-	Vírus parainfluenza 4b, humano, cepa CH19503	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Metapneumovirus humano</i>	-	Vírus sincial respiratório, humano, cepa 9320	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Cladosporium</i> spp	-	Vírus influenza, infeccioso A/PR/8/34	-	Vírus sincial respiratório, humano, cepa Long	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Coronavírus 229E, humano	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Rinovírus, genogrupo A, humano	-	Vírus de varicela Zoster (tipo B)	-

## 14. Histórico de versões

Número da versão	Capítulo e designação
2019-07-22	4. Reagentes fornecidos 6. Reagentes adicionais e equipamentos necessários 9.2. Preparação da mistura de PCR 9.3. Configuração do instrumento de PCR 10. Controle de qualidade

## 15. Explicação dos símbolos

### Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico <i>in-vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote
	Válido até
	Temperatura de conservação
	Referência do produto
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

### Símbolos específicos do teste

Não aplicável

## 16. Literatura

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.