

MycAssay™ Pneumocystis

Applied BioSystems 7500

Amostras Respiratórias

REF 080-035

Utilização prevista

MycAssay™ Pneumocystis está indicado para a utilização por profissionais de laboratório qualificados para a detecção qualitativa do DNA genómico de *Pneumocystis jirovecii* extraído de amostras respiratórias do tracto respiratório inferior (p. ex., amostras brônquicas) como ajuda no diagnóstico em doentes adultos com suspeita de terem pneumonia por *P. jirovecii*.

MycAssay™ Pneumocystis foi validado para a utilização com o equipamento Applied BioSystems 7500 (utilizando o software SDS versão 1.4).

Resumo e explicação

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente *carinii*) (PCP) é uma pneumonia oportunista comum em doentes imunocomprometidos, especialmente em doentes com infecção VIH avançada e SIDA¹. É habitualmente adquirida na comunidade e subaguda na sua apresentação, conduzindo à insuficiência respiratória progressiva e à morte² se não for tratada. A profilaxia com trimetoprim-sulfametoxazol (Bactrim ou Septrin) é administrada rotineiramente a muitos doentes de risco, uma prática que reduziu substancialmente a incidência de PCP, mas a progressão ocorre e os indivíduos que não sabem que são VIH positivos podem apresentar SIDA com PCP³. A PCP também ocorre noutros doentes imunocomprometidos, incluindo receptores de transplantes de órgãos sólidos, hipogamaglobulinemia e leucemia crónica.

Actualmente, o diagnóstico de PCP baseia-se em métodos microscópicos uma vez que não é possível fazer culturas de *P. jirovecii* em laboratórios de microbiologia de rotina. A lavagem broncoalveolar (BAL) é o meio preferido de colheita de amostras. Os métodos habituais para o diagnóstico incluem imunofluorescência (IF) ou fluorescência directa e a coloração histológica de amostras⁴.

MycAssay™ Pneumocystis é um kit de diagnóstico molecular para a detecção de *P. jirovecii* com base na tecnologia de PCR com sinais moleculares (molecular beacon)⁵. Todo o procedimento da análise, incluindo a extracção de DNA da amostra clínica, pode ser concluído em 4 horas, ou apenas 2 horas se o DNA extraído já estiver disponível. Este ensaio traz o benefício directo da eficácia laboratorial melhorada combinada com uma análise rápida que conduz a prováveis benefícios clínicos. A precisão diagnóstica da análise depende largamente da qualidade da amostra.

Princípios do procedimento

A seguir à mistura dos reagentes no kit MycAssay™ Pneumocystis com uma amostra contendo a sequência de DNA alvo de *Pneumocystis* (uma porção da subunidade grande ribossómica mitocondrial de *Pneumocystis*), a termociclagem resulta na ocorrência da amplificação do DNA. O ensaio também contém um Controlo de Amplificação Interno (IAC), um fragmento de DNA não presente em genomas de *Pneumocystis*, outros genomas fúngicos, bacterianos ou humanos, para detectar substâncias inibitórias da PCR e confirmar a funcionalidade dos reagentes do ensaio.

Os alvos de ADN amplificados são detectados com sinais moleculares; amostras de hibridização de oligonucleótidos de cadeia única que formam uma estrutura de haste e ansa (stem-and-loop). A ansa contém uma sequência de amostras que é complementar à sequência alvo, e a haste é formada pela ligação de sequências de braço complementares que se encontram localizadas de ambos os lados da sequência de amostras. Um fluoróforo, que fluoresce quando excitado por luz com o comprimento de onda apropriado, é ligado covalentemente à extremidade de um braço e um supressor, que suprime a fluorescência do fluoróforo quando se encontra em grande proximidade física, é ligado covalentemente à extremidade do outro braço. Os sinais moleculares não entram em fluorescência quando se encontram livres na solução. No entanto, quando se hibridizam a uma cadeia de ácido nucleico que contém uma sequência alvo, são submetidos a uma alteração conformacional que lhes possibilita entrarem em fluorescência. A quantidade de fluorescência em

¹ Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis*: 10: 1713-20.

² Miller RF, Allen E, Copas A, Singer M, Edwards SG. Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. *Thorax* 2006; 61:716-21.

³ Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. (2001). New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA*: 286: 2450-60.

⁴ Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM; ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:655-64.

⁵ Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*: 14: 303-308.

qualquer ciclo, ou a seguir ao ciclo, depende da quantidade de produtos da amplificação presentes nessa altura. O sistema de PCR em Tempo Real SmartCycler monitoriza simultaneamente a fluorescência emitida por cada sinal.

Precauções

- O kit destina-se a ser utilizado apenas por profissionais de laboratório. Os procedimentos são necessários para manipulações não aerossol de amostras. As precauções normais e as directrizes institucionais devem ser seguidas no manuseamento de todas as amostras. A Myconostica Ltd. disponibiliza uma Ficha de dados de segurança do material.
- Este teste destina-se apenas a utilização diagnóstica *in vitro*.
- Este teste destina-se apenas a utilização com o equipamento Applied BioSystems 7500 com o software SDS versão 1.4.
- Devem ser utilizadas tiras de tubos para PCR MicroAmp® Optical (ver secção Materiais/equipamentos para mais detalhes) com este kit. A utilização de consumíveis de plástico diferentes pode invalidar os resultados do ensaio.
- Não utilize reagentes ou controlos se as bolsas protectoras estiverem abertas ou quebradas à chegada.
- Os reagentes e os controlos não são intercambiáveis entre kits com números de lote divergentes.
- Nunca junte reagentes ou controlos de tubos diferentes mesmo que pertençam ao mesmo lote.
- Nunca utilize reagentes ou controlos após o seu prazo de validade.
- Os reagentes e os controlos não devem voltar a ser congelados ou reutilizados após a abertura.
- Use roupas protectoras e luvas descartáveis enquanto manipular os kits de reagentes.
- Evite a contaminação microbiana e com desoxirribonuclease (DNAse) dos reagentes ao remover as alíquotas dos tubos.
- Recomenda-se a utilização de pontas de pipetas com filtro descartáveis de baixa retenção e isentas de DNAse ou pontas de pipetas de deslocamento positivo.
- Utilize uma nova ponta para cada amostra ou reagente.
- Elimine os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, federais, estatais e locais.
- Para evitar a contaminação com produtos de amplificação de *Pneumocystis* ou do controlo de amplificação interno (IAC), não abra os tubos de reacção após a amplificação.
- Podem ser analisados controlos adicionais de acordo com as directrizes ou requisitos dos regulamentos locais, estatais, provinciais e/ou federais ou de organização acreditadas.
- Não coma, beba nem fume nas áreas em que as amostras e os reagentes dos kits são manuseados.
- Concentrações baixas de DNA podem ser instáveis se não forem conservadas correctamente. Recomenda-se que as extracções de DNA de amostras clínicas sejam conservadas a -80 °C para preservar a sua integridade. Múltiplos ciclos de descongelação e recongelação devem ser igualmente evitados sempre que possível.

Conteúdo do kit

Descrição

O kit consiste em cinco bolsas de folha seladas com 3 compartimentos, podendo cada uma delas ser utilizada separadamente. Cada bolsa contém reagentes suficientes para 8 reacções.

		<u>Volume</u>
Tubo 1 (Tampa cor- de-laranja)	dNTPs MgCl ₂ Solução tamponada com complexo de DNA polimerase	66 µL
Tubo 2 (Tampa azul)	<0,01% primários <0,01% sinais moleculares <0,0001% Controlo de Amplificação Interno (IAC) O Controlo de Amplificação Interno é um plasmídeo de ADN recombinante que abriga uma sequência não-infecciosa não relacionada com nenhuma das sequências alvo (<i>Pneumocystis</i>) Tampão Tris-HCl	66 µL
Tubo 3 (Tampa transparente)	Controlo negativo Água	25 µL
Tubo 4 (Tampa preta)	Controlo positivo <0,0001% DNA de controlo positivo A molécula do controlo positivo é um plasmídeo recombinante que abriga as sequências alvo <i>Pneumocystis</i> Tampão Tris-HCl	25 µL

O kit contém igualmente:

- CD-ROM do Protocolo do MycAssay™ *Pneumocystis* Myconostica
- Instruções de utilização

- Certificado de análise

Conservação

O kit deve ser conservado congelado (-15 a -25 °C) até ao prazo de validade indicado no rótulo da caixa do kit, momento em que deve ser eliminado em conformidade com as regulamentações locais.

Uma vez aberta uma bolsa, o conteúdo deve ser utilizado imediatamente, sem voltar a congelar nem reutilizar.

Materiais/equipamentos necessários mas não fornecidos

- Sistema de PCR em Tempo Real 7500 da Applied Biosystems (incluindo o manual do utilizador, o computador em anexo e o software SDS, versão 1.4).
- Tira de 8 tubos MicroAmp® Optical (Applied BioSystems, referência: 4316567).
- Tira de 8 tampas MicroAmp® Optical (Applied BioSystems, referência: 4323032).
- Microcentrífuga com adaptador para tubos para PCR de 0,2 mL.
- Agitador vórtex
- Prateleira de suporte para tubos para PCR.
- Micropipetas (volumes necessários 7,5 µL – 20 µL)
- Pontas de filtro de baixa retenção estéreis
- Luvas descartáveis, sem pó
- Solução de descontaminação de DNA patenteada
- Caneta marcadora permanente
- Kit de isolamento de DNA (ver em baixo)

Amostra

A amostra para o ensaio MycAssay™ Pneumocystis é ADN total extraído de amostras BAL clínicas. Para este efeito recomenda-se o seguinte kit de isolamento de ADN e equipamento, fornecido pela Myconostica Ltd., que foi utilizado durante a validação:

- Kit de Extração de DNA Fúngico MycXtra® (REF: 080-005 disponível na Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Placa de adaptação para Vórtex (REF: 080-015 disponível na Myconostica)

Observações metodológicas

- Antes de começar, leia todo o protocolo.
- O processo completo do MycAssay™ Pneumocystis (excluindo a extração de DNA) demora aproximadamente 2 horas, dependendo do número de amostras analisadas.
- A preparação da análise deve ser efectuada numa estação de trabalho de PCR ou num laboratório pré-PCR. Se não houver uma estação de trabalho de PCR disponível, a análise deve ser preparada numa área específica do laboratório⁶, que seja regularmente limpa com reagentes de descontaminação de ADN.
- No entanto, evite utilizar reagentes de descontaminação de DNA durante a preparação da PCR em tempo real uma vez que podem inibir o ensaio.
- Utilize micropipetas para transferência de fluidos. Para a preparação destas reacções devem ser utilizadas micropipetas específicas que devem ser regularmente descontaminadas.
- Recomenda-se a utilização de pontas de filtro de baixa retenção para assegurar que nenhum DNA é perdido durante a preparação do procedimento.
- **Exerça precaução ao manipular o tubo 4. Este contém material de ADN padrão e a contaminação pode resultar em resultados de análise positivos falsos.**
- Use sempre luvas.
- Todos os tubos devem ser tapados a seguir à utilização e antes da sua eliminação.
- Anote com precisão as posições das amostras quando são processadas amostras de vários doentes.

⁶ Para um exemplo ver Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *em* PCR Primer, 2ª Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. EUA.

Procedimento para a utilização:

1. Preparação da PCR em tempo real

- 1.1 Para começar, ligue o sistema de PCR em Tempo Real AB7500 (equipamento e computador associado) e abra o software SDS v1.4. Introduza os nomes de utilizador e as palavras-passe se exigido.
- 1.2 Assegure-se de que a área de trabalho foi limpa com reagentes de descontaminação de DNA e deixe secar completamente; evite utilizá-los durante a preparação do ensaio uma vez que o excesso de solução de limpeza pode inibir as reacções de PCR.
- 1.3 Cada bolsa contém um de cada um dos tubos 1, 2, 3 e 4. Em cada bolsa existem reagentes suficientes para executar 8 reacções. Devem ser realizadas pelo menos uma reacção com controlo positivo e uma reacção com controlo negativo por execução em que os reagentes são de um único kit. Por conseguinte, uma bolsa pode analisar 6 amostras de doentes. Se for necessário analisar mais de 6 amostras, pode utilizar-se mais de uma bolsa se as bolsas utilizadas forem do mesmo lote. Pode ser analisado um máximo de 38 amostras de doente utilizando as 5 bolsas do kit.
- 1.4 Calcule o número de reacções necessárias consultando a tabela abaixo:

Número de bolsas	Número máximo de amostras de doente
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

- 1.5 Retire o número adequado de bolsas do congelador. Não utilize bolsas que já não estejam seladas. Se as amostras de doentes tiverem sido congeladas após a extracção, remova-as igualmente do congelador.
- 1.6 Abra o número necessário de bolsas e retire os tubos. Se for utilizada mais de uma bolsa, mas se for executado apenas um conjunto de controlos positivos e negativos, só é necessário retirar os tubos 3 e 4 de uma das bolsas. **Exerça precaução ao manipular o tubo 4. Este contém material de controlo positivo de DNA e a contaminação pode dar origem a resultados de análise positivos falsos.**
- 1.7 Deixe o conteúdo dos tubos descongelar colocando-os sobre a bancada do laboratório durante 5-10 minutos, assegurando-se que o conteúdo de cada tubo descongela antes de prosseguir. Agite o conteúdo dos tubos e as amostras de doentes no vórtex; prossiga com uma breve centrifugação numa microcentrífuga para garantir a acumulação de todo o conteúdo na base dos tubos antes de utilizar.
- 1.8 Coloque o número necessário de tubos para PCR na prateleira de suporte. **Nunca toque no fundo dos tubos de reacção com as mãos.**
- 1.9 Prepare sempre o controlo negativo primeiro, seguido pelas amostras do doente. O controlo positivo deve ser sempre preparado em último lugar.
- 1.10 Os volumes de reagente e de DNA são apresentados na seguinte tabela:

Reagente	Reacção		
	Controlo negativo	Amostra do doente	Controlo positivo
Tubo 1 (tampa cor-de-laranja)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tubo 2 (tampa azul)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Tubo 3 (tampa transparente)	10 µL	-	-
Amostra do doente	-	10 µL	-
Tubo 4 (tampa preta)	-	-	10 µL
Volume total	25 µL	25 µL	25 µL

- 1.11 Adicione os reagentes na ordem apresentada na tabela anterior; o tubo 1, em seguida o tubo 2, seguido pelo padrão (controlo negativo, amostra do doente ou controlo positivo). Tome cuidado ao retirar alíquotas do tubo 1; o líquido é ligeiramente viscoso e pode aderir à aresta interna do tubo. Se isto acontecer, volte a centrifugar para acumular o conteúdo final na base do tubo antes de tentar remover as alíquotas finais.
- 1.12 Utilize uma nova ponta de pipeta para cada transferência de líquido. Volte a tapar cada tubo de reagente a seguir à utilização e elimine-o imediatamente, assim como todo o conteúdo restante, num recipiente de resíduos clínicos que possa ser selado. Os reagentes não utilizados não podem ser guardados para utilização posterior.
- 1.13 Tenha um cuidado adicional ao pipetar o tubo 4 (controlo positivo de DNA) para assegurar que não contamina outro tubo de reacção. Fechar as tampas dos outros tubos de reacção antes de abrir o tubo 4 pode reduzir o risco de contaminação cruzada.
- 1.14 Certifique-se de que todas as tampas dos tubos de reacção se encontram firmemente fechadas. Tome nota das posições de cada amostra nas tiras de tubos. Rotule (por exemplo: na tampa) o primeiro tubo de cada tira se for utilizada mais de uma tira de tubos. Centrifugue os tubos de reacção durante 10 segundos utilizando uma mini-centrífuga com adaptador para tubos para PCR de 0,2 mL. Inspeccione visualmente se existem bolhas nas misturas da reacção.
- 1.15 Avance imediatamente para a secção 2. As reacções do MycAssay™ Pneumocystis permanecem estáveis na bancada durante até 60 minutos.
- 1.16 A seguir à preparação do PCR, certifique-se de que a área de trabalho volta a ser perfeitamente limpa utilizando reagentes de descontaminação de DNA.

2. Realizar a execução

- 2.1 Abra o software AB 7500 SDS, versão 1.4, e introduza o seu nome de utilizador e a palavra-passe.
- 2.2 Insira o **CD-ROM do Protocolo do MycAssay Pneumocystis Myconostica**.
- 2.3 No menu **Quick Startup** (Início rápido) seleccione a primeira opção: **Create New Document...** (Criar novo documento)
- 2.4 Seleccione as definições conforme apresentado abaixo. Seleccione o modelo **MycAssay Pneumocystis SDS1_4v3_1.sdt** do CD-ROM através de **Browse...** (Pesquisar)
- 2.5 Dê um Nome de Placa adequado à execução. Abaixo pode encontrar um exemplo:

New Document Wizard

Define Document
Select the assay, container, and template for the document, and enter the operator name and comments.

Assay: Standard Curve (Absolute Quantitation)

Container: 96-Well Clear

Template: MycAssay Pneumocystis SDS1_4v3_1.sdt

Run Mode: Standard 7500

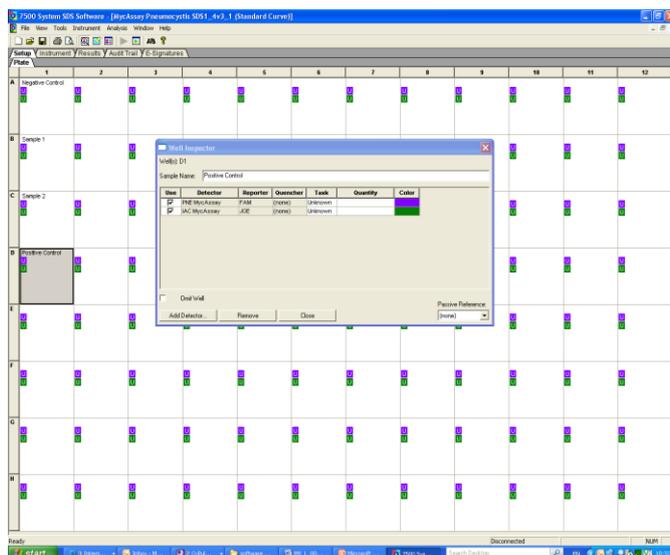
Operator: your name

Comments:

Plate Name: Pneumocystis_23MAR10_NAME

< Back Next > Finish Cancel

- 2.6 Clique em **Finish** (Terminar). Será aberto um novo documento contendo os parâmetros e detectores de PCR definidos automaticamente para este ensaio. Na vista **Plate** (Placa) do separador Setup (**Configuração**) utilize **Well Inspector** (Inspector de poços) (selecione um poço e pressione Ctrl+1 ou clique com a tecla direita do rato) para atribuir o nome aos poços de acordo com as posições das amostras em 1.14.
Por exemplo:



- 2.7 Quando todos os poços possuírem nomes adequados, grave a execução, mantendo o **Plate Name** (Nome da placa) como nome de ficheiro.
- 2.8 Inicie a execução no separador **Instrument** (Equipamento) clicando no botão **Start** (Iniciar). Para determinar quanto tempo a execução demorará a terminar é apresentada uma contagem decrescente junto ao botão **Start** (Iniciar).

3. Análise e interpretação de dados

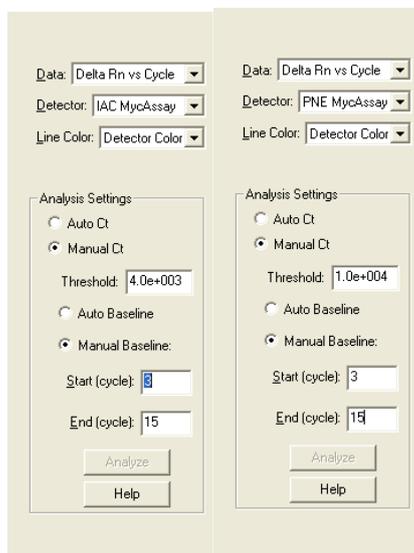
- 3.1 Logo que a execução tenha terminado, clique na seta verde na barra do menu superior para actualizar.
3.2 Abra a visualização **Amplification Plot** (Gráfico da amplificação) do separador **Result** (Resultados). No lado direito defina os limiares para cada canal da seguinte forma:

::

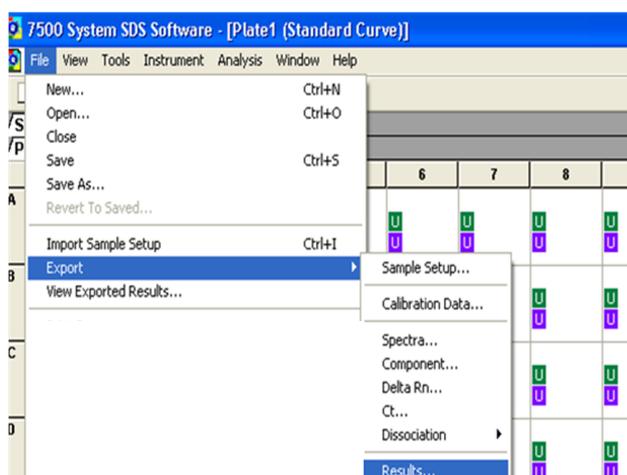
PNE MycAssay = 10000

IAC MycAssay = 4000

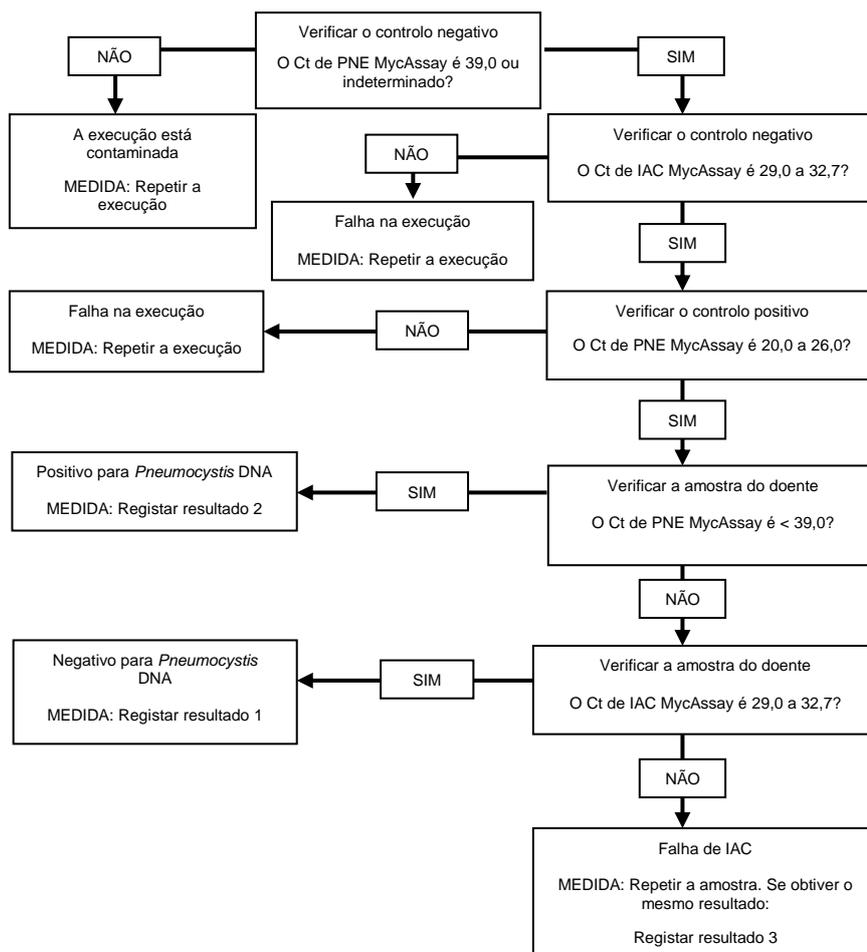
- 3.3 A **Manual Baseline** (Parâmetros base manuais) deve permanecer em 3 – 15 para ambos os detectores. Clique no botão **Analyze** (Analisar) para activar estas alterações. Por exemplo:



- 3.4 Grave as alterações.
3.5 Seleccione os poços contendo amostras e exporte o ficheiro de relatório **File>Export>Results...** (**Ficheiro>Exportar>Resultados...**) conforme apresentado abaixo:



- 3.6 Para evitar confusão, grave o ficheiro com o mesmo nome do próprio ficheiro da execução. Lembre-se de gravar o ficheiro num local apropriado.
3.7 Quando solicitado, active **Export only selected wells** (Exportar apenas poços seleccionados) e clique em **OK**.
3.8 Abra o ficheiro .csv gravado com Excel ou outro software de folha de cálculo similar.
3.9 Analise cada amostra, começando com os controlos, conforme indicado no fluxograma abaixo (também podem ser encontrados detalhes na tabela apresentada abaixo do fluxograma):



Amostra	PNE MycAssay Ct	IAC MycAssay Ct	Interpretação	Medida subsequente
Controlo negativo	39,0 ou indeterminado	Entre 29,0 e 32,7	Controlo negativo aceitável	Os resultados do doente são válidos
Controlo negativo	39,0 ou indeterminado	<29,0 ou >32,7	Falha no controlo negativo	Repetir a execução completa
Controlo negativo	<39,0	Entre 29,0 e 32,7	Contaminação	Repetir a execução completa
Controlo positivo	Entre 20,0 e 26,0	N/D	Controlo positivo aceitável	Os resultados do doente são válidos
Controlo positivo	<20,0 ou >26,0	N/D	Falha no controlo positivo	Repetir a execução completa
Doente	39,0 ou indeterminado	Entre 29,0 e 32,7	Negativo para <i>Pneumocystis</i>	Registar resultado: Resultado 1*
Doente	<39,0	N/D	Positivo para <i>Pneumocystis</i>	Registar resultado: Resultado 2*
Doente	39,0 ou indeterminado	<29,0 ou >32,7	Falha do IAC na amostra	Repetir a amostra: Resultado 3*

*Ver Relatório Clínico do resultado 1, 2 ou 3

4. Resolução de problemas

4.1 O controlo negativo gerou um sinal positivo no canal FAM:

- Ocorreu contaminação durante a preparação. Os resultados de toda a execução não são fiáveis como sendo precisos.
- Repita toda a execução, tendo muito cuidado ao adicionar os padrões, em particular o controlo positivo (tubo 4), para assegurar que não ocorre contaminação cruzada.
- Certifique-se de que a área de trabalho e os instrumentos estão adequadamente descontaminados antes e depois de utilizar.
- O controlo negativo foi posicionado incorrectamente no equipamento.
- Tenha o cuidado para que todas as reacções sejam correctamente anotadas no software e que as tiras de tubos sejam colocadas no aparelho com a orientação correcta.
- Foram utilizados tubos ou placas não recomendados.
- Os limiares só são válidos na utilização dos tubos e tampas MicroAmp® recomendados.

4.2 O valor Ct de IAC do controlo negativo não se situa dentro do intervalo aceitável:

- A PCR foi inibida.
- Certifique-se de que a área de trabalho e os instrumentos estão perfeitamente secos após a utilização de agentes de descontaminação, antes da preparação da PCR.
- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.
- Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.
- O reagente do tubo 1 ou 2 não foi adicionado à reacção da PCR ou foi adicionada a quantidade a dobrar do tubo 2.
- Repita a execução tendo cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observarem-se níveis mais altos ou mais baixos de líquido num tubo de reacção, comparativamente aos outros.
- Foram utilizados tubos ou placas não recomendados.
- Os limiares só são válidos na utilização dos tubos e tampas MicroAmp® recomendados.

4.3 O controlo positivo está negativo/fora do intervalo:

- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.
- Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.
- Ocorreu um erro durante a preparação e o padrão do controlo positivo (tubo 4) foi colocado no tubo de reacção errado.
- Repita a execução tendo muito cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observar um nível mais alto de líquido num tubo de reacção e um nível mais baixo noutra, comparativamente ao normal.
- O reagente do tubo 1 ou 2 não foi adicionado à reacção.
- Repita a execução tendo cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observarem-se níveis mais baixos de líquido neste tubo de reacção, comparativamente aos outros.
- O controlo positivo foi posicionado incorrectamente no equipamento.
- Tenha o cuidado para que todas as reacções sejam correctamente anotadas no software e que as tiras de tubos sejam colocadas no aparelho com a orientação correcta.
- Foram utilizados tubos ou placas não recomendados.
- Os limiares só são válidos na utilização dos tubos e tampas MicroAmp® recomendados.

4.4 Amostra(s) de doentes apresenta(m) resultado 3 - "Inválido":

- É provável que a(s) amostra(s) clínica(s) extraída(s) contenha(m) inibidores da PCR.
- Recomenda-se que o DNA de amostras clínicas seja extraído utilizando o kit de Extracção de DNA Fúngico MycXtra®.

4.5 Não existem resultados para qualquer canal com amostras ou controlos:

- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.
- Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.
- O equipamento utilizado não funciona correctamente.
- Verifique se o seu equipamento de PCR em tempo real tem o histórico de manutenções actualizado e se foi totalmente calibrado conforme descrito no Guia de Instalação e Manutenção.
- Foi utilizado um ficheiro de protocolo incorrecto durante a configuração do software.
- Consulte a secção 2 e seleccione o ficheiro de protocolo correcto, conforme especificado para cada tipo/versão de software, do CD-ROM do Protocolo Myconostica. Só pode ser carregado o ficheiro apropriado para o software. Repita a execução utilizando o ficheiro de protocolo correcto.
- Foram utilizados tubos ou placas não recomendados.
- Os limiares só são válidos na utilização dos tubos e tampas MicroAmp® recomendados.

Se tiver mais dúvidas ou problemas ou se tiver problemas, contacte o Apoio Técnico (productsupport@lab21.com)

Características e limitações do desempenho

Todas as características e reivindicações de desempenho analítico e clínico para o ensaio MycAssay Pneumocystis foram originalmente determinadas no Cepheid Smartcycler. Para avaliar a transferência do ensaio para a plataforma de PCR em Tempo Real AB7500 e para demonstrar equivalência entre as 2 plataformas, determinados estudos foram repetidos na plataforma AB7500. Os resultados desses estudos encontram-se documentados abaixo. Os estudos que foram efectuadas no Cepheid Smartcycler® encontram-se indicados.

Sensibilidade analítica

Com o protocolo anteriormente descrito e uma molécula de DNA de *Pneumocystis* recombinante criada na Myconostica, o limite de detecção (LoD) para *Pneumocystis* foi determinado como sendo < 30 cópias. Este valor foi determinado utilizando um plasmídeo de DNA recombinante que abriga a sequência alvo. A sequência alvo *Pneumocystis* é mitocondrial, por isso, existirão numerosas cópias por célula, mas não se sabe quantas.

Selectividade analítica

A selectividade analítica foi testada com DNA extraído de uma variedade de espécies fúngicas e não-fúngicas diferentes. As espécies seguintes não apresentaram um resultado positivo:

Alternaria alternata, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Blastomyces capitatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cladosporium spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Doratomyces microsporus*, *Fusarium solani*, *Histoplasma capsulatum*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhodotonia rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon capitatum* The following bacterial species did not report a positive result; *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*.

O DNA genómico humano não apresenta um resultado positivo com este ensaio.

Substâncias interferentes (contra-indicações para a utilização)

(Os seguintes dados foram criados com o kit MycAssay™ Pneumocystis kit durante estudos de validação utilizando o Cepheid SmartCycler®. A validação foi efectuada para demonstrar a equivalência de desempenho entre plataformas.)

Os compostos seguintes foram analisados com concentrações clinicamente relevantes e considerados como não inibindo o ensaio: acetilcisteína, anfotericina, dipropionato de beclometasona, budesonida, colistimetato de sódio, propionato de fluticasona, fumarato de formoterol di-hidratado, brometo de ipratrópio, lidocaína, manitol, sulfato de salbutamol, salmeterol, septrin (trimetoprim-sulfametoxazol), cloreto de sódio, cromoglicato de sódio, terbutalina e tobramicina.

Avaliação do desempenho

(Os seguintes dados foram criados com o kit MycAssay™ Pneumocystis kit durante estudos de validação utilizando o Cepheid SmartCycler®. A validação foi efectuada para demonstrar a equivalência de desempenho entre plataformas.)

O cut-off clínico com um Ct de 39,0 foi estabelecido a seguir à análise de um conjunto de amostras clínicas obtidas de populações de doentes diferentes.

Amostras clínicas colhidas por lavagem broncoalveolar (BAL) obtidas em 2 hospitais, extraídas com o kit MycXtra® e conservadas foram utilizadas para avaliar o desempenho do kit MycAssay™ Pneumocystis. Foram feitas comparações entre os resultados da PCR e a microscopia de imunofluorescência.

PCR vs Diagnóstico de microscopia

	Microscopia positiva	Microscopia negativa		
PCR positiva	45	8	0,85	PPV
PCR negativa	2	33	0,94	NPV
	0,96	0,80		
	Sensibilidade	Especificidade		

Tabela 1: Especificidade e sensibilidade diagnóstica do kit MycAssay™ Pneumocystis comparativamente com microscopia de imunofluorescência.

A tabela 1 representa dados obtidos de doentes com HIV diagnosticada, doentes não infectados com HIV e doentes com estado de HIV indeterminado. Doentes com pneumonia por *Pneumocystis* possuem quantidades altamente variáveis de organismos detectáveis; quando menor o valor Ct maior a possibilidade de doença. Doentes com HIV e pneumonia por

Pneumocystis tendem a ter números mais elevados de organismos detectáveis do que doentes que não estejam infectados com o vírus, mas a sobreposição é considerável. O gráfico de dispersão na Figura 1 abaixo demonstra esta sobreposição. Para conclusão, como o conjunto de dados da Tabela 1 incluía doentes cujo estado de HIV era desconhecido, o gráfico de dispersão deste grupo é incluído na Figura 1 (coluna 3):

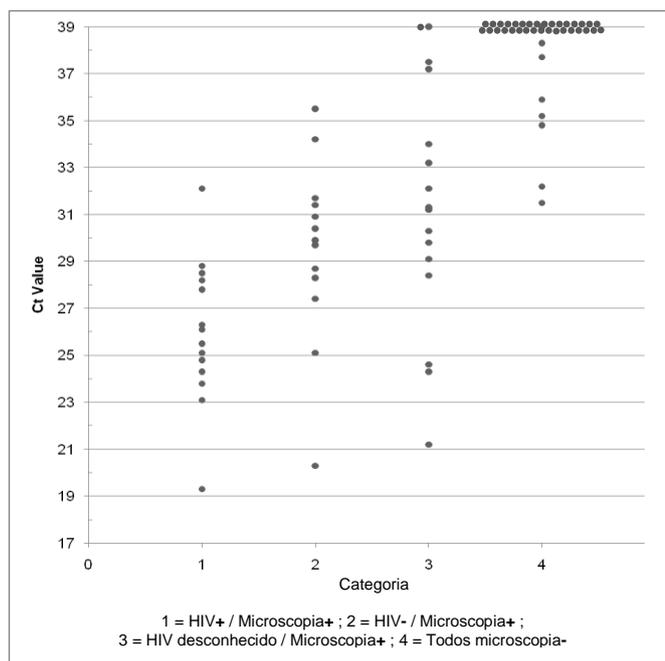


Figura 1: Gráfico de dispersão dos valores Ct obtidos a partir do DNA extraído de amostras respiratórias de doentes. São descritos quatro grupos.

Relatório clínico

O kit MycAssay™ *Pneumocystis* foi concebido como uma ajuda no diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis*. Os resultados têm de ser contextualizados na doença clínica do doente e noutros resultados de análises de diagnóstico.

Os seguintes são relatórios recomendados, dependendo cada um da interpretação do resultado do ensaio.

Resultado n.º 1

“*Pneumocystis jirovecii* não detectado.”

Resultado n.º 2

“*Pneumocystis jirovecii* detectado. Resultado positivo. Estado do valor Ct”

Resultado n.º 3

“Análise falhada; presença de inibidores ou de outra substância desconhecida.”

Quanto menor o valor Ct maior a probabilidade da doença. Os valores Ct perto do *cut-off* de 39,0 são mais prováveis de representarem colonização do que infecção, mas alguns doentes podem ter a doença com muito poucos *P. jirovecii* presente, representando uma amostra fraca antes do tratamento ou a natureza de carga fúngica nesse doente específico.

Limites do procedimento

- O limite principal deste procedimento relaciona-se com a qualidade da amostra principal:
 - Se a amostra for muito pequena ou se não tiver sido colhida na área afectada do pulmão, a análise será menos sensível e pode ser falsamente negativa.
 - As amostras da BAL devem ser centrifugadas antes da extracção do DNA do sedimento.
 - Os dados demonstraram igualmente que a redução no volume do sobrenadante utilizado no processo de extracção, alcançada pelo passo de centrifugação, diminui a proporção de inibidores que entram no sistema.
- Embora o procedimento de extracção de DNA fúngico MycXtra™ tenha sido concebido para remover os inibidores da PCR, nem todos os fármacos ou populações de doentes foram avaliados.
- O procedimento não foi totalmente avaliado em esputo nem em amostras induzidas com solução salina ou amostras provenientes de crianças.
- Podem ser obtidos resultados positivos falsos provenientes da contaminação externa da amostra ou da análise original. Essa contaminação pode surgir do ar contaminado com *P. jirovecii*, uma técnica experimental fraca no que se refere ao controlo positivo ou contaminação externa (especialmente pipeta) com DNA de *P. jirovecii*.
- Uma vez que um resultado positivo verdadeiro pode ser obtido de doentes que estejam transitoriamente ou persistentemente colonizados com *P. jirovecii*, é necessária a avaliação clínica na interpretação do resultado da análise.

AUTORIZAÇÃO

TopTaq™ Hot Start fornecido por QIAGEN. QIAGEN® é uma marca comercial registada da Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha.

Este produto é comercializado sob a licença do *Public Health Research Institute*, Newark, New Jersey, EUA e pode ser utilizado sob os direitos de patente do PHRI apenas para o diagnóstico humano *in vitro*.

Applied BioSystems é uma marca comercial registada da Applied Biosystems Corporation ou das suas subsidiárias nos EU e/ou determinados outros países.

SmartCycler® é uma marca comercial registada da Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, EUA.



Lab21, 184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA, United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882
Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

