

**VIASURE**

Real Time PCR Detection Kit



*Pneumocystis jirovecii*  
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Diese Gebrauchsanleitung bezieht sich auf die folgende Referenz:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENZ
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444207 / VS-JIR124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Verweis auf das mit dem BD MAX™ System zu verwendende Produkt.

**NOTE:** Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Die Gebrauchsanweisung (IFU) liegt dem Kit in englischer/spanischer Version bei.

**EN** For download IFUs from other languages, please enter in **certest.es/viasure/labeling**. Once you be there, follow the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**ES** Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**DA** For at downloade IFUS fra andre sprog, skal du gå ind på **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, skal du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, bedes du kontakte: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**DE** Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**FR** Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**IT** Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**NO** For å laste ned IFUS fra andre språk, vennligst skriv inn i **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, følg instruksjonene for tilgang til språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, vennligst kontakt: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**PT** Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**SV** För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på **certest.es/viasure/labeling**. När du är där följer du instruktionerna för att få tillgång till det språk du behöver. Om du behöver ytterligare information kan du kontakta: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**TR** IFUS'u diğer dillerden indirmek için lütfen **certest.es/viasure/labeling** adresine girin. Oraya girdikten sonra, lütfen ihtiyacınız olan dile erişim için talimatları takip edin. Daha fazla bilgiye ihtiyacınız varsa, lütfen [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) adresinden iletişime geçin.

Contact [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) if your language is not on the list / Wenden Sie sich an [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es), wenn Ihre Sprache nicht auf der Liste steht.

*Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.*

*Hinweis: Der Anwender sollte den Hersteller und die zuständige Behörde des Mitgliedstaates, in dem er als Anwender und/oder Patient niedergelassen ist, über jeden schwerwiegenden Zwischenfall im Zusammenhang mit dem Produkt informieren.*

## Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation .....	5
3.	Principle of the procedure .....	5
4.	Reagents provided .....	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user .....	6
6.	Transport and storage conditions.....	6
7.	Precautions for users .....	7
8.	Test procedure .....	8
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	8
8.2.	Sample preparation and DNA extraction .....	8
8.3.	PCR protocol .....	9
9.	Result interpretation .....	12
10.	Limitations of the test .....	13
11.	Quality control .....	14
12.	Performance characteristics.....	14
12.1.	Clinical sensitivity and specificity .....	14
12.2.	Analytical sensitivity .....	15
12.3.	Analytical specificity .....	15
12.4.	Analytical reactivity .....	16

## Inhalt

1.	Verwendungszweck.....	17
2.	Zusammenfassung und Erläuterung .....	17
3.	Verfahrensprinzip.....	17
4.	Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien.....	18
5.	Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung .....	18
6.	Transport- und Lagerbedingungen .....	19
7.	Sicherheitshinweise für Benutzer .....	19
8.	Testverfahren .....	20
8.1.	Probenentnahme, -lagerung und Transport .....	20
8.2.	Probenvorbereitung und DNA-Extraktion .....	21
8.3.	PCR-Protokoll .....	21

---

9.	Ergebnisinterpretation.....	25
10.	Grenzen des Tests.....	26
11.	Qualitätskontrolle .....	27
12.	Testeigenschaften.....	27
12.1.	Klinische Empfindlichkeit und Spezifität .....	27
12.2.	Analytische Empfindlichkeit .....	28
12.3.	Analytische Spezifität .....	29
12.4.	Analytische Reaktivität .....	30
	Bibliography/ Literaturverzeichnis.....	31
	Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien .....	31
	Trademarks.....	31

---

## ENGLISH

---

### 1. Intended use

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time PCR test designed for the qualitative detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in respiratory samples (bronchoalveolar lavage) from patients suspected of respiratory infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the identification of *Pneumocystis jirovecii* in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of DNA and subsequent real-time PCR, employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. DNA from respiratory samples is detected using fluorescent reporter dye probes specific for *Pneumocystis jirovecii*.

### 2. Summary and Explanation

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) is an acute and life-threatening lung disease caused by the fungus *Pneumocystis jirovecii*. PCP is an important disease of immunocompromised humans, particularly patients with HIV, but also patients with an immune system that is severely suppressed for other reasons. In humans with a normal immune system, it is an extremely common silent infection. In developing regions of the world, the prevalence of PCP was once thought to be much lower, but studies have shown that the lower reported incidence is likely a failure to accurately diagnose.

The symptoms of PCP are nonspecific, in patients with HIV tends to present much later, often after several weeks of symptoms, compared with PCP associated with other immunocompromising conditions. Symptoms of PCP include the following: progressive exertional dyspnea, fever, non-productive cough, chest discomfort, weight loss, chills and hemoptysis (rare).

PCP is difficult to diagnose as a result of the associated nonspecific signs and symptoms. Because *P. jirovecii* cannot be propagated in culture, microscopic visualization of cysts or trophic forms in pulmonary specimens with cytochemical or immunofluorescent staining with monoclonal antibodies and/or DNA amplification are the standard procedures to detect this microorganism.

### 3. Principle of the procedure

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of DNA from *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples. After DNA isolation, the identification of *Pneumocystis jirovecii* is performed by the amplification of a conserved region of the large-subunit (mt LSU) rRNA gene using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent

signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	475/520	Large-subunit (mt LSU) rRNA gene
Internal control (IC)	530/565	-

Table 1. Target, channel and genes.

## 4. Reagents provided

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Barcode	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	1D foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°: VS-JIR124 (444207).

## 5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442828 or 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- N-Acetyl-L-cysteine (recommended N-Acetyl-L-cysteine Ref. A7250, Merck KGaA).
- Nuclease-free water.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

## 6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes, the product can be used up to 24 months.

## 7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health care professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification

criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.

- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

## 8. Test procedure

### 8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on bronchoalveolar lavages (BALs). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 4°C for up to 7 days, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 7 days), we recommend shipping at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 4°C for up to 7 days or frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  or ideally at  $-80^{\circ}\text{C}$  for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The respiratory samples must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

If sputum samples are used, they can be tested according to recommendations cited below.

### 8.2. Sample preparation and DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Pipette 200  $\mu\text{L}$  of BAL into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.
2. For sputum samples, add acetylcysteine (recommended N-Acetyl-L-cysteine Ref. A7250, Merck KGaA) to the sample at a 1:1 ratio (i.e. 250  $\mu\text{L}$  of sputum and 250  $\mu\text{L}$  of acetylcysteine 100 mg/ml), mix by vortexing and heat  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. Pipette 200  $\mu\text{L}$  of the pretreated sputum into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.



## 8.3. PCR protocol

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

### 8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE *Pneumocystis jirovecii*.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
  - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 700 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher and have barcoded foil snap-in tubes, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
  - a. Snap-In 2 Barcode: 1D (concerning *Pneumocystis jirovecii* reaction tube).
  - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
  - c. Snap-In 4 Barcode: another reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
  - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	<i>P. jirovecii</i>	50	200	0	33*
530/565 (HEX)	IC	80	200	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 3. PCR settings.

\* The use of a clinical threshold of Ct 33 in this test system (equalling 3000 copies/ml) allows to distinguish between high and low fungal load and therefore provides valuable information that helps to differentiate between infected and colonized patient. This cut off was based on the reference values recovered from the literature as well as in the sensitivity and specificity values obtained in the clinical evaluation of the product. See Section 12. Performance characteristics.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation, in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), as well.

		False Receiving Channel				
Channel		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

11) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 5).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			41	63°C	✓

Table 5. PCR protocol.

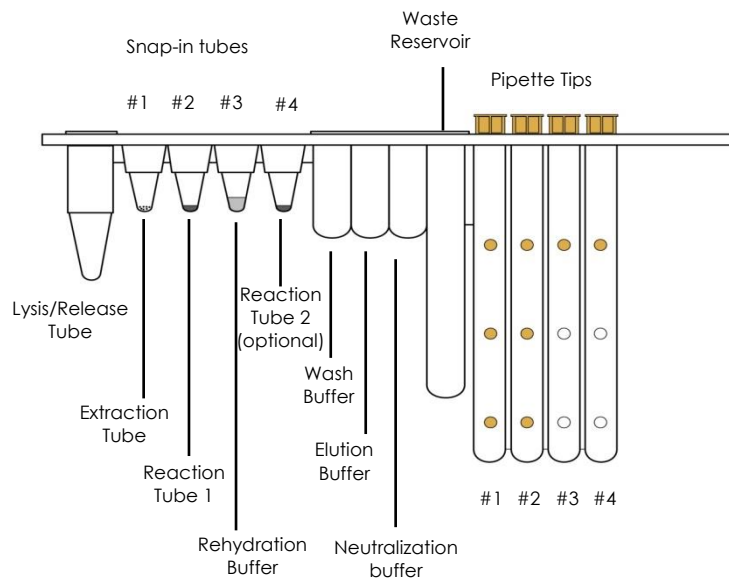
12) Click the "Save Test" button.

### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of *Pneumocystis jirovecii* reaction tubes (1D foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
  - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
  - In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
    - Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.

- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
  - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE *Pneumocystis jirovecii* (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

### 8.3.4. BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.

- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot...".
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen.

## 9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred that meets the setting criteria.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

Results should be read and analyzed using the following table:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (475/520)	Internal Control (530/565)	Interpretation
+	+/-1	<b><i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA Detected <sup>1</sup></b>
-	+ <sup>2</sup>	<b><i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA Not Detected <sup>2</sup></b>
-	_2	<b>Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.<sup>2</sup></b>
IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.</b>
INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.</b>

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

**1** A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 33. The Internal Control (IC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

**2** A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the internal control is positive (Ct less than 35). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each PCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

NOTE: New samples may be tested in the same run with repeat samples.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

## 10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with BAL. In addition, if sputum samples are used, they can be tested with the recommendations cited above.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Pneumocystis jirovecii* suspicious samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of the *mt LSU rRNA* gene used in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other respiratory microorganisms, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
  - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
  - Improper processing procedures (including DNA extraction).
  - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
  - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *Pneumocystis jirovecii* strains.
  - Organism levels in the specimen below the limit of detection or cutoff for the assay.
  - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
  - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.

- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable fungus and does not imply that these fungi are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of *Pneumocystis jirovecii* targets sequences.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *Pneumocystis* infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- A negative result does not preclude the presence of *Pneumocystis jirovecii* DNA in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest *Pneumocystis* infection, re-testing increasing sample volume should be considered.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample, or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

## 11. Quality control

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Internal Control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical samples (bronchoalveolar lavages) already characterized as positive or negative for *P. jirovecii*. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Institute of Medical Microbiology and Virology, Technische Universität Dresden (Germany)	Bronchoalveolar lavages	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>P. jirovecii</i>

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR assay*	<i>P. jirovecii</i>	38	128	0	5	88% (79 – 94)	100% (98 – 100)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\* RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR assay is a qualitative assay, samples with concentrations of  $\geq 3000$  copies/ml were considered positive

Due to the importance of establishing a correct diagnosis, a cut off value was considered in order to obtain an estimation of the fungal burden and therefore distinguish between infected and colonized patient. This cut off was based on the reference values recovered from the literature (1. Louis M, Guitard J, Jodar M, et al. Impact of HIV infection status on interpretation of quantitative PCR for detection of pneumocystis jirovecii. J Clin Microbiol. 2015;53(12):3870-3875; 2. Fauchier T, Housseine L, Gari-Toussaint M, Casanova V, Marty PM, Pomares C. Detection of pneumocystis jirovecii by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-Positive and HIV-Negative Patients. J Clin Microbiol. 2016;54(6):1487-1495), as well as sensitivity and specificity values obtained in this clinical study. Fungal load higher than  $3 \times 10^4$  copies/ml ( $C_t < 30$ ) is very suggestive of *P. jirovecii* Pneumonia, while fungal load below  $3 \times 10^3$  copies/ml ( $C_t > 33$ ) usually corresponds to colonization.

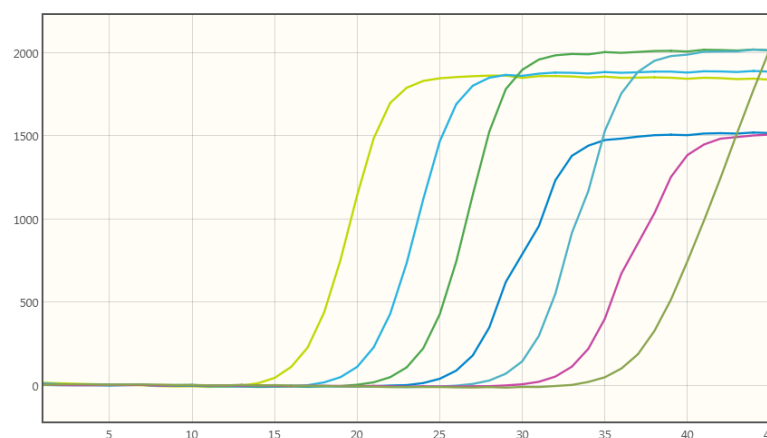
The comparator assay method used in the clinical evaluation was RealStar® Pneumocystis jirovecii PCR (Altona). This method provides quantification of the fungal load since Pneumocystis jirovecii quantification standards are included in each run. From the 43 samples that showed a quantification value  $> 3 \times 10^3$  copies/ml using the comparator assay, 38 showed  $C_t$  value  $< 33$  using VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. On the other hand, all the samples that showed a quantification value  $< 3 \times 10^3$  copies/ml showed a  $C_t$  value  $> 33$  or were negative.

Results show agreement to detect *Pneumocystis jirovecii* using VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 236 copies per reaction on bronchoalveolar lavages (BALs) with a positive rate of  $\geq 95\%$ :

Figure 2. Dilution series of *Pneumocystis jirovecii* ( $2.36 \times 10^7$  -  $2.36 \times 10^1$  copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).



## 12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Pneumocystis jirovecii* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	HHV6 strain Z29	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	HHV6 Type A	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	HHV6 Type B	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	HSV-1 strain MacIntyre	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
BK Virus Type Ib-2	-	HSV-2 MS	-	<i>Listeria innocua</i> Serotype 6a/strain CCUG 15531	-
BK Virus Type IV	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/strain CCUG 15528	-
Bocavirus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 1/2b	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Strain CIP 59.53	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Parvovirus B19	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Citomegalovirus strain AD-169	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-	Human rhinovirus	-
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotype Cloaca B	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotype Cloaca A	-	JC Virus Type 1A	-	<i>Toxoplasma gondii</i> Type II	-
Epstein-Barr virus	-	JC Virus Type 2B	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Varicella-Zoster Virus Ellen	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Hepatitis A	-				

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

## 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was evaluated against DNA extracted from *P. jirovecii* Type 1A, *P. jirovecii* g885652 and *P. jirovecii* j888023, showing positive results.



---

## DEUTSCH

---

### 1. Verwendungszweck

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist ein automatisierter Echtzeit-RT-PCR-Kit zum qualitativen Nachweis der DNA von *Pneumocystis jirovecii* in Atemwegsproben (bronchoalveolären Lavagen) von Patienten, bei denen nach ärztlicher Einschätzung Verdacht auf eine Atemwegsinfektion besteht. Dieser Test soll in Kombination mit den klinischen Symptomen und epidemiologischen Risikofaktoren des Patienten die Identifizierung von *Pneumocystis jirovecii* erleichtern. Bei dem Assay wird das BD MAX™ System zur automatisierten DNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-PCR durch Einsatz der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln des BD MAX™ Systems verwendet. DNA aus Atemwegsproben wird mit fluoreszierenden Reporterfarbstoffsonden nachgewiesen, die spezifisch für *Pneumocystis jirovecii* sind.

### 2. Zusammenfassung und Erläuterung

*Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie (PCP) ist eine akute und lebensbedrohliche Lungenerkrankung, die durch den Pilz *Pneumocystis jirovecii* verursacht wird. PCP ist eine wichtige Erkrankung bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem, insbesondere HIV-Patienten, aber auch bei Patienten, deren Immunsystem aus anderen Gründen stark unterdrückt ist. Bei Menschen mit normalem Immunsystem handelt es sich um eine äußerst häufige stille Infektion. In den Entwicklungsregionen der Welt wurde die Prävalenz der PCP früher für viel niedriger gehalten. Studien haben jedoch gezeigt, dass die geringere gemeldete Inzidenz wahrscheinlich auf ungenaue Diagnose zurückzuführen ist.

Die Symptome der PCP sind unspezifisch. Bei HIV-Patienten treten sie in der Regel viel später auf, oft erst mehrere Wochen nach Einsetzen der Symptome, als bei PCP im Zusammenhang mit anderen immunschwächenden Erkrankungen. Zu den Symptomen der PCP gehören: fortschreitende Belastungsdyspnoe, Fieber, nichtproduktiver Husten, Thoraxbeschwerden, Gewichtsverlust, Schüttelfrost und Hämoptyse (selten).

Die PCP ist aufgrund ihrer unspezifischen Anzeichen und Symptome schwer zu diagnostizieren. Da *P. jirovecii* nicht in Kulturen vermehrt werden kann, sind die mikroskopische Darstellung von Zysten oder Trophozoiten in Lungenproben durch zytochemische oder Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalen Antikörpern und/oder DNA-Amplifikation die Standardverfahren zum Nachweis dieses Mikroorganismus.

### 3. Verfahrensprinzip

Der VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist für den qualitativen Nachweis der DNA von *Pneumocystis jirovecii* in Atemwegsproben vorgesehen. Nach der DNA-Isolation erfolgt die Identifizierung von *Pneumocystis jirovecii* durch Amplifikation einer konservierten Region des Gens für die rRNA der großen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms (mtLSU, mitochondrial large subunit) mithilfe spezifischer Primer und einer fluoreszenzmarkierten Sonde.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Gefäß bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase) in stabilisierter Form sowie eine interne Kontrolle zur Überwachung des Extraktionsprozesses und/oder einer eventuellen Inhibition der Polymeraseaktivität.

Zielsequenz	Kanal	Gen
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	475/520	Gen für die mtLSU-rRNA
Interne Kontrolle (IC)	530/565	-

Tabelle 1. Zielsequenz, Kanal und Gene.

#### 4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Reagenzien:

Reagenz/Material	Beschreibung	Barcode	Menge
<i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction tube	Eine Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und interner Kontrolle in stabilisierter Form	1D-Folie	2 Beutel mit je 12 transparenten Röhrchen
Rehydration Buffer tube	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	11-Folie	1 Beutel mit je 24 transparenten Röhrchen

Tabelle 2. Reagenzien und Materialien im VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System mit der Kat.-Nr. VS-JIR124 (444207).

#### 5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

In der nachstehenden Liste sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät: BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.-Nr.:442828 oder 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Kartuschen) (Ref.-Nr.: 437519).
- Vortexmischer
- Mikropipetten (präzise zwischen 2 und 1000 µl)
- N-Acetyl-L-Cystein (empfohlen: N-Acetyl-L-Cystein Ref.-Nr. A7250, Merck KGaA).
- Nuklease-freies Wasser
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe

## 6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 40 °C transportiert und gelagert werden.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel, die die Reaktionsgefäße enthalten, kann das Produkt bis zu 24 Monate lang verwendet werden.

## 7. Sicherheitshinweise für Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für den Gebrauch durch professionelle Anwender bestimmt, beispielsweise Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und Techniker, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Laborbereich durchgeführt werden, ist Sorge dafür zu tragen, dass das VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, das BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraction Kit, sonstige zusätzlich für den Test erforderliche Reagenzien und das BD MAX™ System nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen die Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase) und Desoxyribonuklease (DNase). Die Verwendung von RNase-/DNase-freien aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen wird empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen (BD MAX™ PCR Cartridge) müssen die Handschuhe gewechselt werden.
- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetikprodukte anwenden. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös und/oder biologisch gefährlich betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, des Transports, der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Proben und Reagenzien müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Persönliche Schutzausrüstung (PSA) verwenden, die den aktuellen Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben entspricht. Abfall in Übereinstimmung mit den örtlichen und Landesvorschriften entsorgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) sind für VIASURE Real Time PCR Detection Kits aufgrund ihrer Einstufung als nicht gesundheits- und umweltgefährdend keine Sicherheitsdatenblätter erforderlich, da Stoffe und/oder Gemische, die die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) festgelegten Kriterien für die Gefahreneinstufung erfüllen, nicht darin enthalten sind bzw. in Konzentrationen vorliegen, die über dem in der genannten Verordnung festgelegten Wert für ihre Deklaration liegen.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch zum BD MAX™ System.

## 8. Testverfahren

### 8.1. Probenentnahme, -lagerung und Transport

The VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde an bronchoalveolären Lavagen (BAL) getestet. Andere Arten von Proben müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Im Allgemeinen sind Atemwegsabstriche in einem sauberen und ordnungsgemäß gekennzeichneten Gefäß mit oder ohne Transportmedium (je nach Probentyp) zu entnehmen und zur Gewährleistung der Testqualität so schnell wie möglich zu verarbeiten. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material bei 4 °C für bis zu 7 Tage transportiert werden. Für den Langzeittransport (über mehr als 7 Tage) empfehlen wir eine Temperatur von -20 °C oder darunter. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu verwenden. Die Proben können bei 4 °C bis zu 7 Tage lang oder zur Konservierung bei -20 °C oder idealerweise bei -80 °C gefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.

Atemwegsproben müssen gemäß den entsprechenden Laborrichtlinien entnommen, transportiert und gelagert werden. Einzelheiten finden sich in den CDC-Leitlinien (Specimen Collection Guidelines). Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> und der IDSA-Leitlinie (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

Werden Sputumproben verwendet, können diese entsprechend den nachstehend gegebenen Empfehlungen getestet werden.

## 8.2. Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktionskits BD MAX™ ExK™ TNA-3 aufgeführten Empfehlungen durchführen. Bitte beachten Sie, dass andere Proben möglicherweise eine Vorbehandlung erfordern. Applikationsspezifische Vorbereitungsmaßnahmen für die Extraktion sind vom Benutzer zu bestimmen und zu validieren.

1. Pipettieren Sie 200 µl BAL in ein BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube und verschließen Sie das Röhrchen mit einer Septumkappe. Sorgen Sie für eine vollständige Vermischung, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System fort.
2. Bei Sputumproben geben Sie Acetylcystein (empfohlen: N-Acetyl-L-Cystein Ref.-Nr. A7250, Merck KGaA) im Verhältnis 1:1 zur Probe (d. h. 250 µl Sputum und 250 µl Acetylcystein 100 mg/ml) und mischen diese durch Vortexen. Erhitzen sie anschließend das Gemisch 10 Minuten lang bei 95 °C. Pipettieren Sie 200 µl des vorbehandelten Sputums in ein BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Sorgen Sie für eine vollständige Vermischung, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System fort.

## 8.3. PCR-Protokoll

Hinweis: Ausführliche Anweisungen entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

### 8.3.1. Erstellen eines PCR-Test-Programms für das VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Hinweis: Wenn Sie den Test für das VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System bereits erstellt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt mit Schritt 8.3.2 fortfahren.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).
- 3) Benennen Sie in der Registerkarte mit den grundlegenden Informationen im Fenster „Test Name“ (Testname) Ihren Test, d. h.: VIASURE *Pneumocystis jirovecii*.
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-3“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Type 5“ (Typ 5).
  - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. Wählen Sie in einem solchen Fall die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert), und stellen Sie das Probenvolumen auf 700 µl ein.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.

- 8) Wenn Sie die Software-Version 5.00 oder höher verwenden und barcodierte Folien-Snap-in-Röhrchen einsetzen, wählen Sie unter „Custom Barcodes“ (Kundendefinierte Barcodes) die folgende Konfiguration:
- Snap-In 2 Barcode (Barcode für Snap-In 2): 1D (für das *Pneumocystis jirovecii* reaction tube).
  - Snap-In 3 Barcode (Barcode für Snap-In 3): 11 (für das Rehydration Buffer tube).
  - Snap-In 4 Barcode (Barcode für Snap-In 4): ein weiteres Reaktionsgefäß (andersfarbige Folie), wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)) wählen (Abschnitt 8.3.1).
- 9) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 3).
- Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen VIASURE for BD<sup>MAX</sup> Test verwendet werden. In einem solchen Fall sind die PCR-Einstellungen und Testschritte für die Einrastposition 2 (grün) und Einrastposition 4 (blau) einzugeben.

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Verstärkung)	Threshold (Schwellenwert)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	<i>P. jirovecii</i>	50	200	0	33*
530/565 (HEX)	IC	80	200	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabelle 3. „PCR settings“ (PCR-Einstellungen).

\* Die Verwendung eines klinischen Schwellenwerts von Ct 33 in diesem Testsystem (entspricht 3000 Kopien/ml) ermöglicht die Unterscheidung zwischen hoher und niedriger Pilzbelastung und liefert somit wertvolle Informationen, die helfen, zwischen infizierten und kolonisierten Patienten zu unterscheiden. Dieser Grenzwert basiert auf den in der Literatur gefundenen Referenzwerten sowie auf den Sensitivitäts- und Spezifitätswerten, die bei der klinischen Bewertung des Produkts ermittelt wurden. Siehe Abschnitt 12. Leistungsmerkmale.

Hinweis: Es empfiehlt sich, die oben für die einzelnen Kanäle aufgelisteten Mindest-Schwellenwerte als Ausgangspunkt einzustellen. Die endgültigen Einstellungen müssen jedoch vom Endanwender bei der Ergebnisinterpretation festgelegt werden, um sicherzugehen, dass die Schwellenwerte in der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurven und über einem etwaigen Hintergrundsignal liegen. Der Schwellenwert für verschiedene Geräte kann aufgrund verschiedener Signalintensitäten variieren.

- 10) Geben Sie in der Registerkarte „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) auch die folgenden Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung) (Tabelle 4) ein.

		False Receiving Channel (Falsch-empfangender Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	0,0	-	0,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	

Tabelle 4. Parameter für das „Spectral Cross Talk“ (spektrale Übersprechen).

- 11) Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 5) ein.

Step Name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Time (s) (Zeit (en))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Initial denaturation (Initiale Denaturierung)	Hold	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung))	2- Temperatur	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

Tabelle 5. PCR-Protokoll.

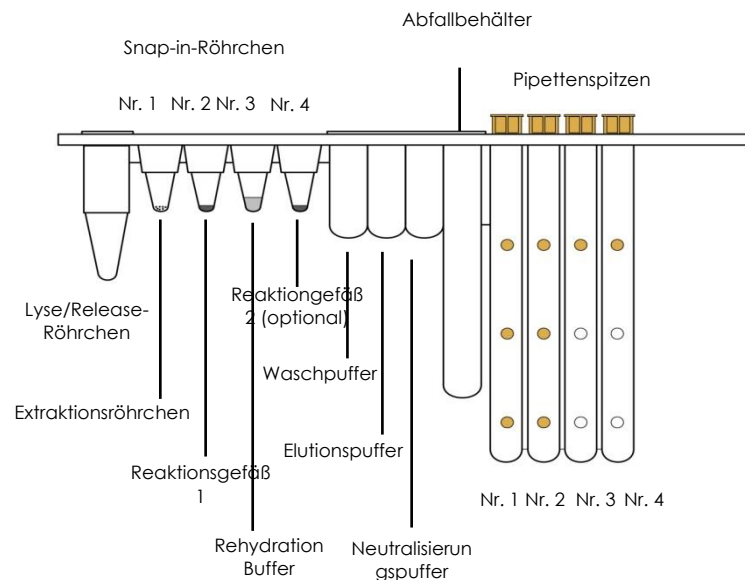
12) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Save Test“ (Test speichern).

### 8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- 1) Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Unitized Reagent Strip (Einzel-Reagenzstreifen) aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- 2) Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (Extraktionsröhrchen, B4, weiße Folie) aus den Schutzbeuteln. Lassen Sie das bzw. die Extraction Tube(s) – weiße Folie – in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- 3) Bestimmen und separieren Sie die erforderliche Anzahl an *Pneumocystis jirovecii* Reaktionsgefäßen (1D-Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1).
  - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
  - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydratation bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
    - i. Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)) (Abschnitt 8.3.1) wählen, bestimmen und separieren Sie die benötigte Anzahl an zusätzlichen VIASURE Reaktionsgefäßen (andersfarbige Folie) und lassen Sie sie in die entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 4, blaue Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydration Buffer tubes (11-Folie), und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
  - a. Achten Sie für eine korrekte Überführung bitte darauf, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet.

Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich der gesamte Puffer am Boden des Röhrchens befindet.

Abbildung 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit.



### 8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option VIASURE *Pneumocystis jirovecii* (falls nicht bereits erstellt, siehe Abschnitt 8.3.1).
- 3) Wählen Sie (optional) im Auswahlmenü die entsprechende Chargennummer des Kits (zu finden an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits).
- 4) Erfassen Sie die Identifikationsnummer des Probenpufferröhrchens im Probenröhrchen-Fenster der Arbeitsliste durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der Arbeitsliste aus, und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen Sie diese Schritte für sämtliche Probenpufferröhrchen aus. Vergewissern Sie sich, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.
- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Sample Buffer Tube Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).
- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge(s) in das BD MAX™ System ein.
- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start Run“ (Durchlauf starten), um den Vorgang zu starten.

### 8.3.4. BD MAX™ Bericht

- 1) Klicken Sie im Hauptmenü auf die Schaltfläche „Results“ (Ergebnisse).
- 2) Doppelklicken Sie auf Ihren Durchlauf in der Liste oder drücken Sie auf die Schaltfläche „View“ (Ansicht).



- 3) Klicken Sie auf „Print“ (Drucken) und wählen Sie folgende Optionen aus: „Run Details, Test Details and Plot...“ (Durchlaufdetails, Testdetails und Plot ...).
- 4) Klicken Sie im Bildschirm „Run Reports“ (Durchlaufberichte) auf die Schaltfläche „Print“ (Drucken) oder „Export“.

## 9. Ergebnisinterpretation

Nähere Angaben zur Auswertung von Daten erhalten Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

Die Datenanalyse durch die BD MAX™ Software erfolgt entsprechend den Herstelleranweisungen. Die BD MAX™ Software gibt die Ct-Werte und Amplifikationskurven für jeden Detektionskanal aller getesteten Proben auf folgende Weise an:

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 3). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.
- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat, der die festgelegten Kriterien erfüllt.
- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 6 auszuwerten.

Überprüfen Sie das Signal der internen Kontrolle, um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Überprüfen Sie zusätzlich, dass keine Störung des BD MAX™ Systems gemeldet wurde.

Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle abzulesen und auszuwerten:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (475/520)	Interne Kontrolle (530/565)	Interpretation
+	+/-1	<b><i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA nachgewiesen <sup>1</sup></b>
-	+2	<b><i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA nicht nachgewiesen <sup>2</sup></b>
-	-2	<b>Unresolved (UNR). Unklar. Aufgrund des Vorliegens von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten.<sup>2</sup></b>
IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmtes Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.</b>
INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.</b>

Tabelle 6. Probenauswertung.

+: Amplifikation erfolgt.

-: Keine Amplifikation erfolgt.

<sup>1</sup> Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 33 liegt. Die interne Kontrolle (IC) kann ein Amplifikationssignal ergeben oder auch nicht. Gelegentlich ist der Nachweis der IC nicht notwendig, da das Vorliegen einer hohen Kopienzahl der Ziel-Nukleinsäure zu deren präferenzierter Amplifikation führen kann.

**2** Eine Probe gilt als negativ, wenn vom Nachweissystem kein Amplifikationssignal in der Probe erfasst wird, die interne Kontrolle jedoch positiv ist (Ct kleiner als 35). Eine Hemmung der PCR-Reaktion kann durch Amplifikation der internen Kontrolle ausgeschlossen werden. Wenn im Fall eines ungelösten Ergebnisses (UNR) bei einer negativen Probe das Signal der internen Kontrolle ausbleibt, wird empfohlen, den Assay entsprechend den folgenden Angaben zu wiederholen.

Im Fall eines weiterhin zweifelhaften Ergebnisses wird empfohlen, die Gebrauchsanleitung und das vom Benutzer verwendete Extraktionsverfahren zu prüfen, die ordnungsgemäße Ausführung aller PCR-Schritte sowie die Korrektheit der Parameter zu prüfen und zu kontrollieren, ob die Kurvenform sigmoid und die Intensität der Fluoreszenz angemessen ist.

HINWEIS: Neue Proben können im selben Durchlauf wie die Wiederholungsproben getestet werden.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.

## 10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für BAL validiert. Werden Sputumproben verwendet, können diese entsprechend den oben gegebenen Empfehlungen getestet werden.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den Atemwegsproben extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweisgrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse eventuell nicht reproduzierbar sind.
- Es besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination mit verdächtigen *Pneumocystis jirovecii*-Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-DNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Die Kombinationen spezifischer Primer und Sonden zum Nachweis des *mtLSU-rRNA*-Gens, die im VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System verwendet werden, zeigen keine signifikante kombinierte Homologie mit dem menschlichen Genom, der menschlichen Mikroflora oder anderen Mikroorganismen, die zu vorhersagbaren falsch positiven Ergebnissen führen könnten.
- Falsch negative Resultate können sich durch verschiedene Faktoren (auch in Kombinationen) wie die folgenden ergeben:

- unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
  - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich DNA-Extraktion);
  - Abbau der DNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
  - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter *Pneumocystis jirovecii*-Stämme beeinträchtigen können;
  - eine Organismenlast in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt;
  - das Vorliegen von qPCR-Inhibitoren oder anderen Arten von Störsubstanzen;
  - Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Pilze vorliegen oder dass diese Pilze infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit von *Pneumocystis jirovecii*-Zielsequenzen hin.
  - Wenn diagnostische Tests auf andere Atemwegserkrankungen negativ sind und das klinische Erscheinungsbild des Patienten sowie die epidemiologischen Informationen nahelegen, dass eine Infektion mit *Pneumocystis* möglich ist, sollte ein falsch negatives Ergebnis in Betracht gezogen und ein erneuter Test des Patienten erwogen werden.
  - Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein von *Pneumocystis jirovecii*-DNA in einer klinischen Probe nicht aus. Wenn klinische Befunde, die Anamnese des Patienten und epidemiologische Informationen auf eine *Pneumocystis*-Infektion hindeuten, sollte ein erneuter Test mit einem höheren Probenvolumen in Betracht gezogen werden.
  - Im Fall von unklaren (UNR), nicht bestimmaren (IND) oder unvollständigen (INC) Ergebnissen bei Verwendung des VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist eine Testwiederholung erforderlich. Unklare Ergebnisse (UNR) können durch Hemmsubstanzen in der Probe oder eine nicht korrekte Rehydratation des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmare oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätstörung zurückzuführen.

## 11. Qualitätskontrolle

In jedem Reaktionsgefäß des VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist eine interne Kontrolle (IC) enthalten, mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird.

## 12. Testeigenschaften

### 12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde mit klinischen Proben (bronchoalveolären Lavagen) von Patienten getestet, die bereits als positiv oder negativ für *P. jirovecii* charakterisiert worden waren. Die Ergebnisse waren wie folgt:

	Standort	Probentyp	Arbeitsablauf	Zielsequenz
1	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Technische Universität Dresden (Deutschland)	Bronchoalveoläre Lavagen	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>P. jirovecii</i>

Tabelle 7. Ort, Probentyp, Arbeitsablauf und Zielsequenzen.

Wahr positive und wahr negative Werte, falsch positive und falsch negative Werte sowie Sensitivität und Spezifität beim VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurden in Relation zu verschiedenen Vergleichstests berechnet, wie in der folgenden Tabelle dargestellt ist:

Standort	Vergleichstest	Zielsequenz	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität
1	RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR Assay*	<i>P. jirovecii</i>	38	128	0	5	88 % (79 – 94)	100 % (98 – 100)

Tabelle 8. Wahr positive (TP) und negative (TN) Werte, falsch-positive (FP) und negative (FN) Werte, Sensitivität, Spezifität für das VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\* RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR Assay ist ein qualitativer Assay. Proben mit Konzentrationen von  $\geq 3000$  Kopien/ml wurden als positiv betrachtet

Aufgrund der Wichtigkeit einer korrekten Diagnosestellung wurde ein Grenzwert festgelegt, um eine Schätzung der Pilzbelastung zu erhalten und auf diese Weise zwischen infizierten und kolonisierten Patienten unterscheiden zu können. Dieser Grenzwert basierte auf den in der Literatur ermittelten Referenzwerten (1. Louis M, Guitard J, Jodar M, et al. Impact of HIV infection status on interpretation of quantitative PCR for detection of pneumocystis jirovecii. J Clin Microbiol. 2015;53(12):3870-3875; 2. Fauchier T, Haseine L, Gari-Toussaint M, Casanova V, Marty PM, Pomares C. Detection of pneumocystis jirovecii by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-Positive and HIV-Negative Patients. J Clin Microbiol. 2016;54(6):1487-1495) sowie auf den in dieser klinischen Studie ermittelten Werte für Sensitivität und Spezifität. Eine Pilzbelastung von mehr als  $3 \times 10^4$  Kopien/ml ( $C_t < 30$ ) deutet sehr stark auf eine *P.-jirovecii*-Pneumonie hin, während eine Pilzbelastung von weniger als  $3 \times 10^3$  Kopien/ml ( $C_t > 33$ ) in der Regel einer Kolonisierung entspricht.

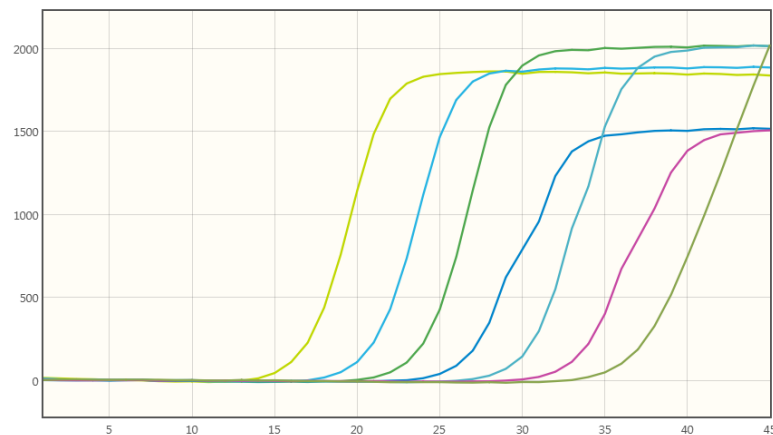
Bei der zur klinischen Bewertung verwendeten Vergleichsmethode handelte es sich um RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR (Altona). Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der Pilzbelastung, da *Pneumocystis jirovecii*-Quantifizierungsstandards in jedem Lauf enthalten sind. Von den 43 Proben, die im Vergleichstest einen Quantifizierungswert von  $> 3 \times 10^3$  Kopien/ml aufwiesen, zeigten 38 bei Verwendung des VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System einen  $C_t$ -Wert  $< 33$ . Auf der anderen Seite zeigten alle Proben, die einen Quantifizierungswert  $< 3 \times 10^3$  Kopien/ml aufwiesen, einen  $C_t$ -Wert  $> 33$  oder waren negativ.

Die Ergebnisse zeigen Übereinstimmung beim Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* mit dem VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Analytische Empfindlichkeit

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System hat eine Nachweisgrenze (LoD) von 236 Kopien pro Reaktion in bronchoalveolären Lavagen (BALs) mit einer Positivrate von  $\geq 95\%$ :

Abbildung 2. Verdünnungsreihe von *Pneumocystis jirovecii* ( $2,36 \cdot 10^7$  –  $2,36 \cdot 10^1$  Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (475/520 (FAM) Kanal).



### 12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des *Pneumocystis jirovecii*-Assays wurde bestätigt durch Testen eines Panels bestehend aus verschiedenen Mikroorganismen, bei denen es sich um die häufigsten Erreger für Atemwegserkrankungen handelt. Mit keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen konnte eine Kreuzreaktivität festgestellt werden:

Kreuzreaktivitätstests					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	HHV6 Stamm Z29	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Humanes Adenovirus, Typen 1-5, 8, 15, 31, 40 und 41	-	HHV6 Typ A	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	HHV6 Typ B	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	HSV-1 Stamm MacIntyre	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
BK-Virus Typ Ib-2	-	HSV-2 MS	-	<i>Listeria innocua</i> Serotyp 6a/Stamm CCUG 15531	-
BK-Virus Typ IV	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)-Virus	-	<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/Stamm CCUG 15528	-
Bocavirus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-ähnliches Virus	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serotyp 1/2b	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-Virus	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Stamm CIP 59.53	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09-Virus	-	Humanes Metapneumovirus A und B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-ähnliches Virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)-Virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-Virus	-	Humane Parainfluenza-Viren 1, 2, 3 und 4	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-Virus	-	Parvovirus B19	-

Kreuzreaktivitätstests					
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotyp A und C	-	Influenza A/Turkey/Germany/R2485+86/2014 (H5N8)-Virus	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)-Virus	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Cytomegalovirus Stamm AD-169	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)- Virus	-	Respiratorisches Synzytialvirus (RSV)	-
Humanes Coronavirus 229E, OC43 und NL63	-	Influenza B/Brisbane/60/2008- ähnliches Virus	-	Humanes Rhinovirus	-
MERS-Coronavirus	-	Influenza B/Florida/04/06-Virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotyp Cloaca B	-	Influenza B/Phuket/3073/2013-Virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotyp Cloaca A	-	JC-Virus Typ 1A	-	<i>Toxoplasma gondii</i> Type II	-
Epstein-Barr-Virus	-	JC-Virus Typ 2B	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Varicella-Zoster-Virus Ellen	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Hepatitis A	-				

Tabelle 9. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.











## 12.4. Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde mit aus *P. jirovecii* Type 1A, *P. jirovecii* g885652 und *P. jirovecii* j888023 extrahierter DNA beurteilt, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

## Bibliography/ Literaturverzeichnis

1. A. Roux et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with or without AIDS, France. Emerging Infectious Diseases journal 2014; 20: 1490–1497.
2. E.J. Calderón et al. Pneumocystis infection in humans: diagnosis and treatment. Expert Review of Anti-infective Therapy 2010; 8: 683–701.
3. J.R. Harris et al. Pneumocystis Jirovecii Pneumonia: Current Knowledge and Outstanding Public Health Issues. Current Fungal Infection Reports Journal, 2010; 4(4): 229-237.
4. P. Rohner et al. Detection of Pneumocystis jirovecii by two staining methods and two quantitative PCR assays. Infection, 2009; 37(3):261-5.

## Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>In-vitro</i> -Diagnostikum		Keep dry Trocken aufbewahren		Use by Verfallsdatum		Manufacturer Hersteller		Batch code (Lot) Chargennummer
	Consult instructions for use Siehe Gebrauchsanweisung		Temperature limitation Temperaturbegrenzung		Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Test(s)		Unique Device Identification Eindeutige Geräteidentifikation		Catalognumber Katalognummer

## Trademarks

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

Change Control / Änderungshistorie		
Version No. / Versionsnr.	Changes / Änderungen	Date / Datum
00	Original version / Ursprüngliche Version.	03/02/2022
01	Typo corrections / Tippfehlerkorrekturen.	08/03/2022
02	Format update. Section 'Transport and storage conditions' update. UDI symbol is included. / Aktualisierung des Formats. Aktualisierung des Abschnitts 'Transport- und Lagerbedingungen'. UDI-Symbol ist enthalten.	06/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tabelle Änderungshistorie.

Revision: 6<sup>th</sup> June 2022

# VIASURE



**CerTest Biotec, S.L.**

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1  
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

[www.certest.es](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev02