

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Pneumocystis jirovecii
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Le presenti istruzioni per l'uso si applicano al seguente prodotto:

PRODUCT / PRODOTTO	REFERENCE / CODICE
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. / Codice del prodotto da usare con il BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Le istruzioni per l'uso (IFU) sono incluse nel kit in versione inglese/spagnolo.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 adresinden iletişime geçin.

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Contatta viasure@certest.es se la tua lingua non è nell'elenco.

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.

Nota: L'utente deve notificare al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito come utente e/o paziente qualsiasi incidente grave relativo al prodotto.

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

Sommario

1.	Usò previsto.....	17
2.	Introduzione e spiegazione	17
3.	Principi del procedimento.....	17
4.	Reagenti forniti	18
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi	18
6.	Condizioni di trasporto e conservazione	18
7.	Precauzioni per gli utenti	19
8.	Procedura di test.....	20
8.1.	Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni.....	20
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione del DNA	20
8.3.	Protocollo PCR.....	21

9.	Interpretazione dei risultati	24
10.	Limiti del test	25
11.	Controllo di qualità	27
12.	Caratteristiche del test	27
12.1.	Sensibilità e specificità clinica	27
12.2.	Sensibilità analitica.....	28
12.3.	Specificità analitica	28
12.4.	Reattività analitica	29
	Bibliography/ Bibliografia	30
	Symbols for IVD components and reagents/ Simboli per reagenti e componenti IVD	30
	Trademarks.....	30

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°C or ideally at -80°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 μL 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 μL of sputum and 250 μL of acetylcysteine 100 mg/ml), mix by vortexing and heat 95°C for 10 minutes. Pipette 200 μL 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.

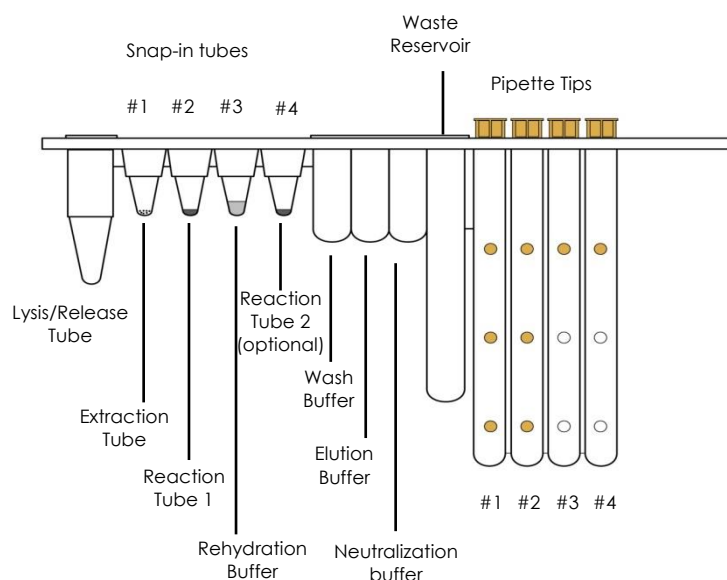
12) Click the “Save Test” button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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).
 - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - b. 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.
 - i. 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	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA Detected ¹
-	+ ²	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA Not Detected ²
-	_2	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.²
IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

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 ≥ 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 3×10^4 copies/ml ($C_t < 30$) is very suggestive of *P. jirovecii* Pneumonia, while fungal load below 3×10^3 copies/ml ($C_t > 33$) usually corresponds to colonization.

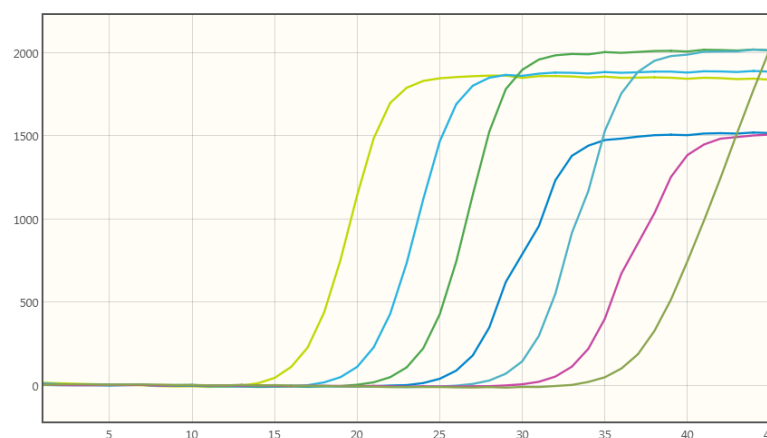
The comparator assay method used in the clinical evaluation was RealStar® Pneumocystis jirovecii PCR (Altona). This method provides quantification of the fungal load since Pneumocystis jirovecii quantification standards are included in each run. From the 43 samples that showed a quantification value $> 3 \times 10^3$ 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* (2.36×10^7 - 2.36×10^1 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.

ITALIANO

1. Uso previsto

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è un test real-time PCR automatizzato progettato per la rilevazione qualitativa del DNA di *Pneumocystis jirovecii* in campioni respiratori (lavaggio broncoalveolare) di pazienti con sospetta infezione respiratoria secondo il parere del medico. L'uso previsto di questo test è quello di facilitare l'identificazione di *Pneumocystis jirovecii* in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e i fattori di rischio epidemiologico. Questo test utilizza il BD MAX™ System per l'estrazione automatizzata del DNA e la successiva real-time PCR, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e ai materiali di consumo del BD MAX™ System. Il DNA dei campioni respiratori viene rilevato utilizzando sonde marcate con un colorante fluorescente specifico per *Pneumocystis jirovecii*.

2. Introduzione e spiegazione

La polmonite da *Pneumocystis jirovecii* (PCP) è una malattia polmonare acuta e potenzialmente letale causata dal fungo *Pneumocystis jirovecii*. La PCP è una malattia importante per i soggetti immunocompromessi, in particolare per i pazienti con HIV, ma anche per i pazienti con un sistema immunitario gravemente depresso per altri motivi. Nei soggetti con un sistema immunitario normale, è un'infezione silente estremamente comune. Nelle regioni del mondo in via di sviluppo, un tempo si pensava che la prevalenza di PCP fosse molto più bassa, ma gli studi hanno dimostrato che l'incidenza più bassa riferita era dovuta probabilmente a una diagnosi non accurata.

I sintomi della PCP sono aspecifici, nei pazienti con HIV la malattia tende a presentarsi molto più tardi, spesso dopo diverse settimane di sintomi rispetto alla PCP associata ad altre condizioni di immunocompromissione. I sintomi della PCP includono i seguenti: dispnea da sforzo progressiva, febbre, tosse non produttiva, dolore toracico, perdita di peso, brividi ed emottisi (rara).

La PCP è difficile da diagnosticare a causa dei segni e dei sintomi aspecifici associati. Poiché *P. jirovecii* non può essere riprodotto in coltura, la visualizzazione microscopica delle cisti e delle forme trofiche nei campioni polmonari con colorazione citochimica o in immunofluorescenza con anticorpi monoclonali e/o l'amplificazione del DNA sono le procedura standard per rilevare questo microorganismo.

3. Principi del procedimento

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è progettato per la rilevazione qualitativa del DNA di *Pneumocystis jirovecii* nei campioni respiratori. Dopo l'isolamento del DNA, l'identificazione di *Pneumocystis jirovecii* viene eseguita attraverso l'amplificazione di una regione conservata del gene rRNA della subunità grande (mt LSU) utilizzando primer specifici e una sonda marcata a fluorescenza.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale

fluorescente proporzionale alla quantità del modello target. Questa fluorescenza viene misurata sul BD MAX™ System.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un test real-time PCR (sonde/primer specifici, dNTP, tampone, polimerasi) in formato stabilizzato e un controllo interno per monitorare il processo di estrazione e/o l'inibizione dell'attività della polimerasi.

Target	Canale	Gene
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	475/520	Gene rRNA della subunità grande (mt LSU)
Controllo interno (CI)	530/565	-

Tabella 1. Target, canale e geni.

4. Reagenti forniti

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System include i materiali e i reagenti indicati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Codice a barre	Quantità
<i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction tube	Una miscela di enzimi, sonde primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno in formato stabilizzato	Sigillo 1D	2 confezioni da 12 provette trasparenti
Rehydration Buffer tube	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparenti

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti con VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con N. di catalogo VS-JIR124 (444207).

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Strumento per Real-time PCR: BD MAX™ System (Cod.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod.:442828 o 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Cod.: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- N-acetil-L-cisteina (raccomandata N-acetil-L-cisteina cod. A7250, Merck KGaA).
- Acqua priva di nucleasi.
- Ponte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo l'apertura delle confezioni in alluminio che contengono le provette di reazione, il prodotto può essere utilizzato fino a un massimo di 24 mesi.

7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso esclusivamente da parte di utilizzatori professionali, come professionisti sanitari e tecnici di laboratorio, formati nell'impiego di tecniche di biologia molecolare.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il BD MAX™ System non siano contaminati. Evitare sempre la contaminazione dei reagenti con microbi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la BD MAX™ PCR Cartridge dopo l'uso. I sigilli della BD MAX™ PCR Cartridge sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Progettare un flusso di lavoro unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e/o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare personal protective equipment (PPE) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.

- In conformità con il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kit non richiede una scheda dati sulla sicurezza (Safety Data Sheet) dei materiali a causa della sua classificazione come non pericoloso per la salute e per l'ambiente, perché non contiene sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione.
- Consultare il manuale utente del BD MAX™ System per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

8. Procedura di test

8.1. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato testato sui lavaggi broncoalveolari (BAL). Altri tipi di campioni devono essere convalidati dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i tamponi respiratori devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente con o senza mezzo di trasporto (in base alla tipologia di campione) ed esaminati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati a una temperatura di 4 °C entro i primi 7 giorni, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 7 giorni), si raccomanda una spedizione a ≤ -20 °C o a temperatura inferiore. Per effettuare il test, è consigliato l'utilizzo di campioni appena raccolti. I campioni possono essere conservati a una temperatura di 4 °C entro i primi 7 giorni, oppure congelati a -20 °C o idealmente a -80 °C. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per evitare il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

I campioni respiratori devono essere prelevati, trasportati e conservati in conformità alle linee guida di laboratorio appropriate. Per i dettagli, consultare le linee guida CDC (linee guida per la raccolta dei campioni). Sito web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> e linee guida IDSA (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).

Se vengono utilizzati campioni di espettorato, questi possono essere testati in conformità alle raccomandazioni riportate di seguito.

8.2. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3. Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

1. Pipettare 200 μ l di BAL in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System.

2. Per i campioni di espettorato, aggiungere acetilcisteina (raccomandata N-acetil-L-cisteina cod. A7250, Merck KGaA) al campione con un rapporto 1:1 (ossia 250 µl di espettorato e 250 µl di acetilcisteina 100 mg/ml), miscelare con vortex e scaldare a 95 °C per 10 minuti. Pipettare 200 µl di espettorato pretrattato in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System.

8.3. Protocollo PCR

Nota: consultare il manuale utente del BD MAX™ System per istruzioni dettagliate.

8.3.1. Creazione di un programma di test PCR per VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: se è stato già creato il test per VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, è possibile saltare il passaggio 8.3.1 e passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Nella schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base), nella finestra "Test Name" (Nome test), nominare il proprio test: VIASURE *Pneumocystis jirovecii*.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
 - a. Nota: il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX. In questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Definito dall'utente) e regolare il volume del campione a 700 µl.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).
- 8) Se si utilizza un software versione 5.00 o superiore e si dispone di provette snap-in di alluminio con codice a barre, in "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) scegliere la seguente configurazione:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Codice a barre Snap-In 2): 1D (per la provetta di reazione per *Pneumocystis jirovecii* reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Codice a barre Snap-In 3): 11 (per la provetta del tampone di reidratazione)
 - c. Snap-In 4 Barcode (Codice a barre Snap-In 4): un'altra provetta di reazione (sigillo diverso) se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1).

9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 3).

- a. Nota: il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE for BD MAX™. In questo caso "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Fasi del test) devono essere completate per entrambe le posizioni 2 (verde) e 4 (blu).

Channel (Canale)	Alias (Alias)	Gain (Guadagno)	Threshold (Soglia)	Ct Min (Ct min)	Ct Max (Ct max)
475/520 (FAM)	<i>P. jirovecii</i>	50	200	0	33*
530/565 (HEX)	Cl	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

Tabella 3. "PCR settings" (Impostazioni di PCR).

* L'utilizzo di una soglia clinica di Ct 33 in questo sistema di test (equivalente a 3000 copie/ml) consente di distinguere tra una carica fungina alta e una bassa e, pertanto, fornisce informazioni preziose che aiutano a differenziare tra un paziente infettato e uno colonizzato. Questa soglia si basava sui valori di riferimento recuperati dalla letteratura e sui valori di sensibilità e specificità ottenuti nella valutazione clinica del prodotto. Vedere paragrafo 12. Caratteristiche del test.

Nota: come punto di partenza, si consiglia di impostare i valori soglia minimi sopraelencati per ciascun canale; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utente finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

10) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross talk spettrale) (Tabella 4):

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Channel (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitazione)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0

Tabella 4. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).

11) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 5).

Step Name (Nome fase)	Profile Type (Tipo profilo)	Cycles (Cicli)	Time (s) (Tempo(i))	Temperature (Temperatura)	Detect (Rilevazione)
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	In attesa	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e appaiamento/estensione (raccolta dati))	Temperatura 2	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

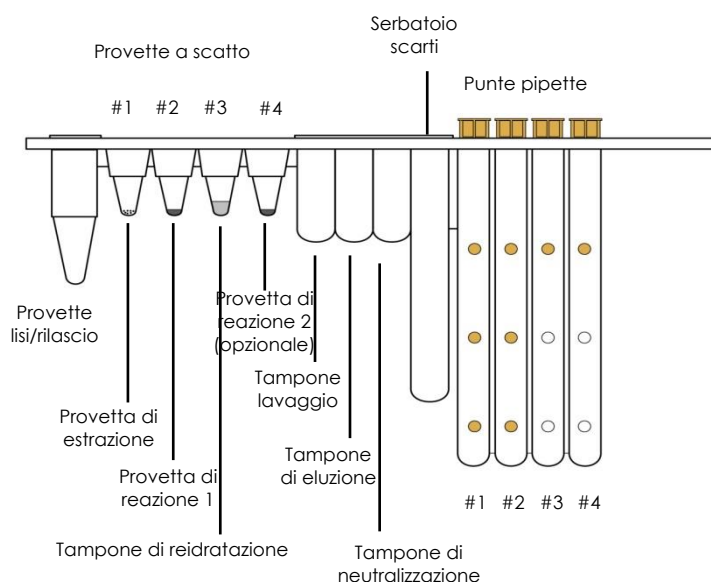
Tabella 5. Protocollo PCR.

12) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una Unitized Reagent Strip dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo delle provette, quindi posizzarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione per *Pneumocystis jirovecii* (sigillo 1D) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
 - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
 - ii. Nota: se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione VIASURE (sigillo diverso) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
- 4) Rimuovere il numero richiesto di provette di tampone di reidratazione (sigillo 11) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
 - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo alla provetta.

Figura 1. Striscia di reagente (TNA) BD MAX™ TNA del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" (Lista di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software del BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare VIASURE *Pneumocystis jirovecii* (se non è ancora stato creato, vedere paragrafo 8.3.1).
- 3) Selezionare il numero relativo al lotto del kit (si trova sulla confezione esterna del kit di estrazione utilizzato) dal menu a tendina (opzionale).
- 4) Inserire il numero identificativo della Sample Buffer Tube nella finestra "Sample tube" (Provetta campione) dalla "Work List" (Lista di lavoro), manualmente oppure scansionando il codice a barre.
- 5) Compilare il codice campione/paziente e/o la finestra "Accession" (Ingresso) nella "Work List" (Lista di lavoro) e cliccare sul pulsante "Save" (Salva). Continuare fino all'inserimento di tutte le Sample Buffer Tube. Assicurarsi che il codice campione/paziente e le Sample Buffer Tube corrispondano.
- 6) Posizionare la Sample Buffer Tube preparata sulle BD MAX™ Rack(s).
- 7) Caricare le griglie sul BD MAX™ System (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridges nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Cliccare "Start Run" (Inizia operazione) per iniziare la procedura.

8.3.4. Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).
- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...)
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report).

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del BD MAX™ System.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 3). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.

- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione che soddisfa i criteri di impostazione.

- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 6.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al BD MAX™ System.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (475/520)	Controllo interno (530/565)	Interpretazione
+	+/- ¹	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA rilevato ¹
-	+ ²	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA non rilevato ²
-	- ²	Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione.²
IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.
INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.

Tabella 6. Interpretazione del campione.

+: Curva di amplificazione presente.

-: Senza curva di amplificazione.

1 Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è inferiore a 33. A volte, il controllo interno (CI) può non mostrare un segnale di amplificazione. A volte il rilevamento del CI non è necessario perché la presenza di un elevato numero di copie del target può provocare l'amplificazione preferenziale di acidi nucleici target-specifici.

2 Un campione viene considerato negativo se non mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rilevamento ma il controllo interno è positivo (Ct inferiore a 35). Un'inibizione della reazione di PCR può essere esclusa dall'amplificazione del controllo interno. In caso di risultati non risolti (UNR) con assenza di un segnale di controllo interno in un campione negativo, è raccomandabile ripetere il test seguendo queste indicazioni.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso e la procedura di estrazione usata dall'utente, di verificare la corretta esecuzione di ciascun passaggio del test PCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

NOTA: i nuovi campioni possono essere testati nella stessa operazione con campioni ripetuti.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con BAL. Inoltre, se vengono utilizzati campioni di espettorato, questi possono essere testati in conformità alle raccomandazioni riportate in precedenza.

- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da campioni respiratori.
- Questo test è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione crociata con campioni sospetti di *Pneumocystis jirovecii* contenenti concentrazioni elevate di DNA target oppure per la contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- Le combinazioni dei primer e delle sonde specifiche per la rilevazione del gene rRNA *mt LSU* usate in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System non mostrano omologie combinate significative con il genoma umano, la microflora umana o altri microrganismi respiratori, rendendo prevedibili i falsi positivi.
- I risultati falsi negativi possono essere dovuti a diversi fattori e a combinazioni di essi; questi includono:
 - Metodi di prelievo, trasporto, considerazione e/o manipolazione dei campioni in corretto.
 - Procedure di preparazione incorrette (inclusa l'estrazione di DNA).
 - Degradazione del DNA durante l'invio/la conservazione e/o la preparazione dei campioni.
 - Le mutazioni o il polimorfismo del primer o delle regioni di legame della sonda possono influenzare il rilevamento di nuovi ceppi o di ceppi sconosciuti di *Pneumocystis jirovecii*.
 - Livelli di organismi nel campione al di sotto del limite di rilevamento o della soglia del test.
 - Presenza di inibitori della qPCR o di altri tipi di sostanze interferenti.
 - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.
- Il risultato positivo di un test non indica necessariamente la presenza del fungo vivo e non implica che tale fungo sia infettivo o che sia l'agente eziologico dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza di sequenze target di *Pneumocystis jirovecii*.
- Se i test diagnostici per altre patologie respiratorie sono negativi e la presentazione clinica e le informazioni epidemiologiche del paziente indicano la possibilità di un'infezione da *Pneumocystis*, è necessario prendere in considerazione un risultato falso negativo e discutere la ripetizione del test.
- Un risultato negativo non esclude la presenza del DNA di *Pneumocystis jirovecii* in un campione clinico. Se le osservazioni cliniche, l'anamnesi e le informazioni epidemiologiche del paziente suggeriscono un'infezione da *Pneumocystis*, è necessario prendere in considerazione la ripetizione del test aumentando il volume dei campioni.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o a una reidratazione non corretta della provetta di miscela di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

11. Controllo di qualità

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un controllo interno (CI) in ogni provetta di reazione, che conferma la corretta esecuzione della tecnica.

12. Caratteristiche del test

12.1. Sensibilità e specificità clinica

Le prestazioni cliniche di VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono state testate utilizzando campioni clinici (lavaggi broncoalveolari) già caratterizzati come positivi o negativi per *P. jirovecii*. I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	Institute of Medical Microbiology and Virology, Technische Universität Dresden (Germania)	Lavaggi broncoalveolari	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>P. jirovecii</i>

Tabella 7. Sede, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori positivi e negativi reali, i valori falsi positivi e falsi negativi, la sensibilità e la specificità di VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono stati calcolati in relazione a ciascun test di confronto, come riportato nella seguente tabella:

Sito	Test di confronto	Target	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità
1	Test PCR per <i>Pneumocystis jirovecii</i> RealStar®*	<i>P. jirovecii</i>	38	128	0	5	88% (79 – 94)	100% (98 – 100)

Tabella 8. Valori positivi (TP) e negativi (TN) reali, valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), sensibilità, specificità per VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* Il test PCR per *Pneumocystis jirovecii* RealStar® è un test qualitativo. I campioni con concentrazioni ≥ 3000 copie/ml sono stati considerati positivi

A causa dell'importanza di stabilire una diagnosi corretta, è stato considerato un valore soglia al fine di ottenere una stima della carica fungina e di distinguere tra un paziente infettato e uno colonizzato. Questa soglia si basava sui valori di riferimento recuperati dalla letteratura (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) e sui valori di sensibilità e specificità ottenuti in questo studio clinico. Una carica fungina superiore a 3×10^4 copie/ml ($C_t < 30$) è estremamente indicativa di polmonite da *P. jirovecii*, mentre una carica fungina inferiore a 3×10^3 copie/ml ($C_t > 33$) generalmente corrisponde a colonizzazione.

Il metodo di test di confronto utilizzato nella valutazione clinica è stato RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR (Altona). Questo metodo fornisce la quantificazione della carica fungina poiché in ciascun ciclo sono inclusi gli standard di quantificazione per *Pneumocystis jirovecii*. Dei 43 campioni che hanno mostrato un valore di quantificazione $> 3 \times 10^3$ copie/ml utilizzando il test di confronto, 38 hanno mostrato un valore di $C_t < 33$ utilizzando

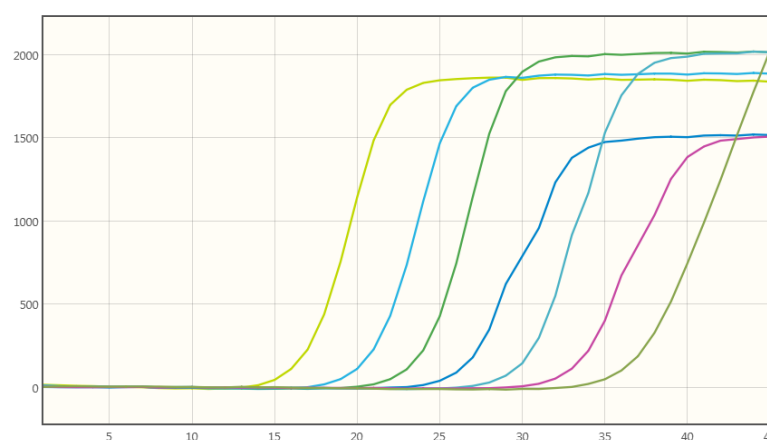
VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. D'altra parte, tutti i campioni che hanno mostrato un valore di quantificazione $<3 \times 10^3$ copie/ml hanno mostrato un valore di Ct >33 o erano negativi.

I risultati mostrano concordanza nel rilevare *Pneumocystis jirovecii* mediante VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilità analitica

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha un limite di rilevamento (LoD) di 236 copie per ogni reazione su lavaggi broncoalveolari (BAL) con un tasso positivo $\geq 95\%$:

Figura 2. Serie di diluizioni dei modelli di *Pneumocystis jirovecii* ($2,36 \times 10^7$ - $2,36 \times 10^1$ copie per reazione) analizzate sul BD MAX™ System [canale 475/520 (FAM)].



12.3. Specificità analitica

La specificità del test *Pneumocystis jirovecii* è stata confermata testando un pannello formato da diversi microorganismi che rappresentano i più comuni patogeni respiratori. Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i seguenti microrganismi testati:

Test di reattività crociata					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	HHV6 ceppo Z29	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Adenovirus umano tipi 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	HHV6 tipo A	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	HHV6 tipo B	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	HSV-1 ceppo MacIntyre	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Virus BK tipo Ib-2	-	HSV-2 MS	-	<i>Listeria innocua</i> sierotipo 6a/ceppo CCUG 15531	-
Virus BK tipo IV	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Listeria ivanovii</i> sierotipo 5/ceppo CCUG 15528	-
Bocavirus	-	Virus del tipo Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Listeria monocytogenes</i> sierotipo 1/2b	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Listeria monocytogenes</i> sierotipo 4b/ceppo CIP 59.53	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Metapneumovirus umano A e B	-

Test di reattività crociata					
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus del tipo Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Virus influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Virus parainfluenzali umani 1, 2, 3 e 4	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus dell'Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Parvovirus B19	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A e C	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Citomegalovirus ceppo AD-169	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Virus respiratorio sinciziale (RSV)	-
Coronavirus umano 229E, OC43 e NL63	-	Virus del tipo Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Rhinovirus umano	-
Coronavirus MERS	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> sierotipo Cloaca B	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> sierotipo Cloaca A	-	Virus JC tipo 1A	-	<i>Toxoplasma gondii</i> Type II	-
Virus Epstein-Barr	-	Virus JC tipo 2B	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Virus varicella-zoster Ellen	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Epatite A	-				

Tabella 9. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.











12.4. Reattività analitica

La reattività di VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata valutata rispetto al DNA estratto da *P. jirovecii* tipo 1A, *P. jirovecii* g885652 e *P. jirovecii* j888023, mostrando risultati positivi.

Bibliography/ Bibliografia

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/ Simboli per reagenti e componenti IVD

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Mantenere asciutto</p>	 <p>Use by Usare entro</p>	 <p>Manufacturer Produttore</p>	 <p>Batch code (Lot) Codice lotto</p>
 <p>Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitazione temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contenuto sufficiente per <n> test</p>	 <p>Unique Device Identification Identificazione e unica del dispositivo</p>	 <p>Catalognumber Numero catalogo</p>

Trademarks

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

Change Control / Controllo modifiche		
Version No. / N. versione	Changes / Modifiche	Date / Data
00	Original version / Versione originale.	04/02/2022
01	Typo corrections / Correzioni di battitura	08/03/2022
02	Format update. Section 'Transport and storage conditions' update. UDI symbol is included. / Aggiornamento del formato. Aggiornamento della sezione "Condizioni di trasporto e conservazione". Il simbolo UDI è incluso	06/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tabella delle variazioni del controllo.

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

One step ahead



F-566 rev02