

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



*Pneumocystis jirovecii*  
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Denne bruksanvisningen gjelder for følgende referanse:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERANSE
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. / Referanse for produkt som skal brukes med BD MAX™ System.

**NOTE:** Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Bruksanvisning (IFU) er inkludert i settet i engelsk/spansk versjon.

**EN** For download IFUs from other languages, please enter in [certest.es/viasure/labeling](https://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](https://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](https://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](https://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](https://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](https://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](https://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](https://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](https://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](https://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 / Kontakt [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) hvis språket ditt ikke er på listen.

*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.*

*Merk: Brukeren bør varsle produsenten og den kompetente myndigheten i medlemsstaten der han er etablert som bruker og/eller pasient om enhver alvorlig hendelse knyttet til produktet.*

## 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

## Innhold

1.	Tiltenkt bruk .....	17
2.	Sammendrag og forklaring .....	17
3.	Grunnleggende prosedyre .....	17
4.	Reagenser som følger med.....	18
5.	Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren .....	18
6.	Transport- og lagringsforhold .....	18
7.	Forholdsregler for brukere.....	19
8.	Testprosedyre.....	20
8.1.	Innsamling, oppbevaring og transport av prøver.....	20

---

8.2.	Klargjøring av prøver og DNA-ekstraksjon .....	20
8.3.	PCR-protokoll .....	21
9.	Tolkning av resultater .....	24
10.	Testens begrensninger .....	25
11.	Kvalitetskontroll .....	26
12.	Ytelsesegenskaper .....	27
12.1.	Klinisk sensitivitet og spesifisitet .....	27
12.2.	Analytisk sensitivitet .....	28
12.3.	Analytisk spesifisitet .....	28
12.4.	Analytisk reaktivitet .....	29
	Bibliography/Litteratur .....	30
	Symbols for IVD components and reagents/Symboler for IVD-komponenter og reagenser.....	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  $-20^{\circ}\text{C}$  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.

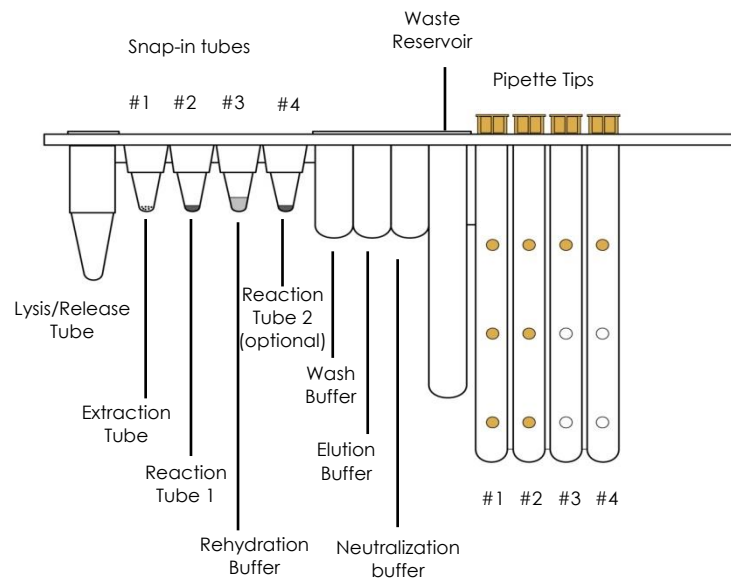
12) Click the "Save Test" button.

### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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	<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.

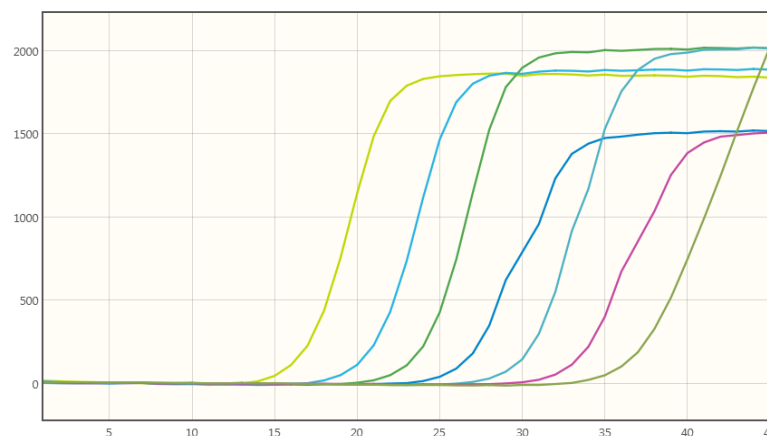
The comparator assay method used in the clinical evaluation was RealStar® Pneumocystis jirovecii PCR (Altona). This method provides quantification of the fungal load since Pneumocystis jirovecii quantification standards are included in each run. From the 43 samples that showed a quantification value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

Result 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.



## NORSK

---

### 1. Tiltenkt bruk

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er en automatisert PCR-test i sanntid, og den er utviklet for kvalitativ deteksjon av DNA fra *Pneumocystis jirovecii* i luftveisprøver (bronkoalveolær lavage), tatt av helsepersonell, fra pasienter med mistenkt luftveisinfeksjon. Denne testen er ment som en hjelp ved identifisering av *Pneumocystis jirovecii* i kombinasjon med pasientens kliniske tegn og symptomer samt epidemiologiske risikofaktorer. Analysen bruker BD MAX™-systemet til automatisert ekstraksjon av DNA og påfølgende sanntids PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmaterieell for BD MAX™-systemet. DNA fra luftveisprøvene påvises ved hjelp av fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for *Pneumocystis jirovecii*.

### 2. Sammendrag og forklaring

Pneumoni med *Pneumocystis jirovecii* (PCP) er en akutt og livstruende lungesykdom som forårsakes av soppen *Pneumocystis jirovecii*. PCP er en viktig sykdom for personer med nedsatt immunsystem, spesielt for HIV-pasienter, men også for pasienter som har kraftig nedsatt immunsystem av andre årsaker. Hos personer med et normalt fungerende immunsystem er det en svært vanlig, stille infeksjon. Tidligere var det antatt at prevalensen av PCP i utviklingsland var mye lavere, men studier har vist at de rapporterte lave forekomstene sannsynligvis er på grunn av feildiagnostisering.

Symptomene på PCP er ikke-spesifikke og presenteres ofte mye senere hos HIV-pasienter, ofte etter flere uker med symptomer, sammenlignet med PCP assosiert med andre tilstander med nedsatt immunforsvar. Symptomene på PCP inkluderer følgende: progressiv anstrengende dyspné, feber, ikke-produktiv hoste, ubehag i brystet, vekttap, frostrier og hemoptyse (sjelden).

På grunn av de ikke-spesifikke tegnene og symptomene er det vanskelig å diagnostisere PCP. Fordi ikke kan propageres i kultur, er standardprosedyrene for påvisning av denne mikroorganismen mikroskopisk visualisering av cyster eller trofiske former i pulmonale prøver med cyto kjemiske eller immunofluorescerende farging med monoklonale antistoffer og/eller DNA-amplifisering.

### 3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er designet for kvalitativ påvisning av DNA fra *Pneumocystis jirovecii* i luftveisprøver. Etter DNA-isolering utføres identifisering av *Pneumocystis jirovecii* gjennom amplifisering av et konservert område av rRNA-gen med stor subenhet (mt LSU) ved bruk av spesifikke primere og en fluorescensmerket probe.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er basert på 5'-eksonuklease-aktiviteten til DNA-polymerase. Under DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sekvensen, og skiller quencher-fargen fra reporterfargen. Denne reaksjonen genererer en

økning i fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av måltemplatet. Denne fluorescensen måles av BD MAX™ System.

Hvert rør i VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder alle komponenter som behøves for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer, polymerase) i et stabilisert format, samt en intern kontroll til monitorering av ekstraksjonsprosessen og/eller hemming av polymeraseaktiviteten.

Mål	Kanal	Gen
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	475/520	rRNA-gen med stor subenhet (mt LSU)
Intern kontroll (IC)	530/565	-

Tabell 1. Mål, kanal og gener.

## 4. Reagenser som følger med

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inkluderer følgende materialer og reagenser, nærmere beskrevet i tabell 2:

Reagens/materiale	Beskrivelse	Strekkode	Mengde
<i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffere, dNTP-er, stabilisatorer og intern kontroll i et stabilisert format	1D-folie	2 poser à 12 blanke rør
Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	11-folie	1 poser à 24 blanke rør

Tabell 2. Reagenser og materialer som følger med i VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med katalognummer VS-JIR124 (444207).

## 5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke er inkludert i VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442828 eller 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl)
- N-Acetyl-L-cystein (anbefalt er N-Acetyl-L-cystein, ref. A7250, Merck KGaA).
- Nukleasefritt vann
- Filterspisser
- Pudderfrie engangshansker.

## 6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter åpning av aluminiumsposene med reaksjonsrørene kan produktet brukes i opptil 24 måneder.

## 7. Forholdsregler for brukere

- Produktet er kun ment å brukes av fagpersonell, f.eks. laboratorie- eller helsepersonell og teknikere, som er opplært i molekylære biologiske teknikker.
- Til diagnostisk bruk *in vitro*.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forseglar ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesesken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lynlåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.
- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktytelsen.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, ekstraksjonssettet BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™ System. Unngå alltid at reagenser kontamineres med mikrober og ribonuklease (RNase)/deoksyribonuklease (DNase). Det anbefales bruk av sterile RNase/DNase-frie aerosolresistente eller "positive displacement"-pipettespisser til engangsbruk. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve. Du må skifte hansker før du håndterer reagenser og kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- For å unngå miljøkontaminering med amplikoner må du ikke brette åpen BD MAX™ PCR Cartridge etter bruk. Forseglingene på BD MAX™ PCR Cartridge er designet for å unngå kontaminering.
- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklær, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk, røyk eller påfør kosmetiske produkter i arbeidsområdet. Vask hendene når testen er utført.
- Prøvene må behandles som potensielt smittefarlige og/eller biologisk farlige, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og de må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, oppbevaring, håndtering og kassering av prøver.
- Prøver og reagenser må håndteres i et biologisk sikkerhetsskap. Bruk personlig verneutstyr (PU) i tråd med de relevante retningslinjene for håndtering av potensielt smittefarlige prøver. Avfall skal kastes i henhold til lokale og delstatlige forskrifter.
- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- I henhold til forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kreves det ikke sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) for VIASURE Real Time PCR Detection Kits ettersom de er klassifisert som ikke helse- eller miljøskadelige fordi de ikke inneholder farlige stoffer og/eller blandinger som oppfyller fareklassifiseringskriteriene tilgjengelig i forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller som har konsentrasjoner høyere enn verdien fastsatt i nevnte forordning i sin deklarasjon.

- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™ System for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.

## 8. Testprosedyre

### 8.1. Innsamling, oppbevaring og transport av prøver

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har blitt testet på bronkoalveolære lavager (BAL-er). Andre typer prøver må valideres av brukeren.

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal utføres under de forhold som valideres av brukeren. Generelt skal luftveisprøver samles inn og merkes på egnet måte i rene beholdere med eller uten transportmedium (avhengig av prøvetypen) og behandles snarest mulig for å garantere kvaliteten av testen. Prøvene skal transporteres ved 4 °C i opptil 7 dager, i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogen materiale. For langvarig transport (over 7 dager) anbefaler vi forsendelse ved ≤ 20 °C eller lavere. Det anbefales å bruke ferske prøver til testen. Prøvene kan oppbevares ved til 4 °C i opptil 7 dager eller fryses ved -20 °C eller ideelt sett ved -80 °C for konservering. Gjentatte sykluser med frysing/tining bør unngås for å forhindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

Luftveisprøvene skal samles inn, transporteres og oppbevares i tråd med relevante retningslinjer for laboratoriet. For mer informasjon, se retningslinjene til CDC (Specimen collection guidelines), nettstedet <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018), og artikkelen 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).

Hvis ekspektoratprøver brukes, kan de også testes i henhold til anbefalingene over.

### 8.2. Klargjøring av prøver og DNA-ekstraksjon

Klargjør prøven i henhold til anbefalingene i bruksanvisningen for ekstraksjonssettet som brukes; BD MAX™ ExK™ TNA-3. Merk at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. Prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon i samsvar med den spesifikke anvendelsen skal utvikles og valideres av brukeren.

1. Pipetter 200 µl av BAL i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube og lukk røret med en membranhet. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.
2. For ekspektoratprøver tilsetter du acetylcystein (anbefalt er N-Acetyl-L-cystein, ref. A7250, Merck KGaA) til prøven med et forhold på 1:1 (dvs. 250 µl av ekspektorat og 250 µl av acetylcystein 100 mg/ml). Bland med vorteksblender og varm til 95 °C i 10 minutter. Pipetter 200 µl av den forhåndsbehandlede ekspektoratprøven opp i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube (prøvebufferrør) og lukk røret med en membranhet. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.

## 8.3. PCR-protokoll

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™ System for detaljerte instruksjoner.

### 8.3.1. Opprette PCR-testprogram for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermbildet "Run" (Kjør) på BD MAX™ System.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) Skriv navnet på testen din i vinduet "Test Name" (Testnavn): f.eks. VIASURE *Pneumocystis jirovecii*.
- 4) Fra nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-3".
- 5) Fra nedtrekksmenyen "Master Mix Format", velg "Type 5".
  - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX-test. I så fall må du velge "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til 700 µl.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Hvis du kjører versjon 5.00 av programvaren eller høyere og har merket de foliebelagte innklikningsrørene med strekkoder under "Custom Barcodes" (Egendefinerte strekkoder), velger du følgende konfigurasjon:
  - a. Snap-In 2 Barcode (Strekkode for innklikningsrør 2): 1D (for *Pneumocystis jirovecii* reaction tube (reaksjonsrør)).
  - b. Snap-In 3 Barcode (Strekkode for innklikningsrør 3): 11 (vedrørende Rehydration Buffer tube).
  - c. Snap-In 4 Barcode (Strekkode for klemme 4): et annet reaction tube (reaksjonsrør) (forskjellig folie) hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1).
- 9) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 3).
  - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™-test. I så fall må "PCR settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) fylles ut for posisjon 2 (grønn) og posisjon 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	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

Tabell 3. "PCR settings" (PCR-innstillinger).

\* Bruken av en klinisk terskel på Ct 33 i dette testsystemet (som tilsvarer 3000 kopier/ml) gjør det mulig å skille mellom stor og liten soppmengde, og dette gir således nyttig informasjon som bidrar til å skille mellom en infisert og en kolonisert pasient. Denne cutoffen var basert på referanseverdiene hentet fra litteraturen samt sensitivitets- og spesifisitetsverdiene innsamlet i den kliniske evalueringen av produktet. Se avsnitt 12. Ytelseegenskaper.

Merk: Det anbefales at man først stiller inn minimum terskelverdiene som er listet opp ovenfor for hver kanal, men de endelige innstillingene må bestemmes av sluttbrukeren under tolkningen av resultatene for å sikre at tersklene faller innenfor den eksponentielle fasen av fluorescenskurvene og over et eventuelt bakgrunnssignal. Terskelverdien for forskjellige instrumenter kan variere grunnet forskjellige signalintensiteter.

10) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) oppgir du i tillegg følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral krysstale) (tabell 4)

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)				
Channel (Kanal)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	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	-

Tabell 4. Parametere for "Spectral Cross Talk" (spektral krysstale).

11) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) oppgir du PCR-protokollen (tabell 5).

Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid(er))	Temperature (Temperatur)	Defect (Påvis)
Initial denaturation (Innledende denaturering)	Vent	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering og herding/forlengelse (datainnsamling))	2 - Temperatur	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

Tabell 5. PCR-protokoll

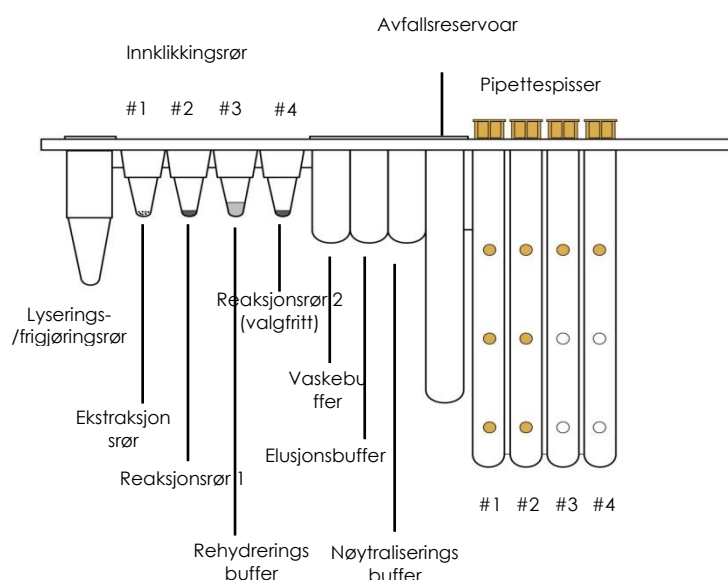
12) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

### 8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

1) Ta ut en separat moduleagensstrimmel fra BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit for hver prøve som skal testes. Dunk forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørene, og sett dem inn i BD MAX™ System prøvestativ.

- 2) Ta ut nødvendig antall BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (ekstraksjonsrør) (B4) (hvit folie) fra beskyttelsesposen. Klikk Extraction Tube(s) (ekstraksjonsrøret(ene)) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmelen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
- 3) Fastslå og adskill egnet antall *Pneumocystis jirovecii* reaction tubes (reaksjonsrør) (1D-folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (klemmeposisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.)
  - a. Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
  - b. For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
    - i. Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (klemmeposisjon 4, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
- 4) Ta ut nødvendig antall Rehydration Buffer tubes (rehydreringsbufferrør) (11-folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
  - a. For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele bufferen er i bunnen av røret.

Figur 1. BD MAX™ TNA reagensstrimmel (TNA) fra BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™ System programvare v4.50A eller nyere.

- 2) I nedtrekksmenyen "Test", velg VIASURE *Pneumocystis jirovecii* (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til prøvebufferrøret i vinduet "Sample Tube" (Prøverør) i "Work List" (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut prøve-/pasient-ID og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i "Work List" (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(-ene).
- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™ System (stativ A settes på venstre side av BD MAX™ System og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser nødvendig antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™ System.
- 9) Lukk døren på BD MAX™ System.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

### 8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Gå til hovedmenyen og klikk på knappen "Results" (Resultater).
- 2) Enten dobbeltklikk på kjøringen din i listen eller trykk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klikk på "Print" (Skriv ut), og velg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott ...).
- 4) Klikk på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller eksporter) på skjermbildet "Run Reports" (Kjøringsrapporter).

## 9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan du analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™ System.

Dataanalysen utføres av BD MAX™-programvaren i henhold til produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 indikerer at programvaren ikke beregnet noen Ct-verdi med den angitte terskelen (se tabell 3). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må sjekkes manuelt.

- En Ct-verdi på -1 indikerer at det ikke har funnet sted noen amplifikasjonsprosess som oppfyller kravene.

Alle andre Ct-verdier må tolkes i sammenheng med amplifikasjonskurven og i henhold til retningslinjene for tolkning av prøver som er angitt i tabell 6.

Sjekk det interne kontrollsignalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™ System.

Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:



<i>Pneumocystis jirovecii</i> (475/520)	Intern kontroll (530/565)	Tolkning
+	+/- <sup>1</sup>	<b><i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA påvist <sup>1</sup></b>
-	+ <sup>2</sup>	<b><i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA ikke påvist <sup>2</sup></b>
-	- <sup>2</sup>	<b>UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- og/eller amplifikasjonsstrinn.<sup>2</sup></b>
IND	IND	<b>IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.</b>
INC	INC	<b>INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.</b>

Tabell 6. Tolkning av prøve.

+: Amplifikasjon fant sted.

-: Ingen amplifikasjon fant sted.

**1** En prøve anses som positiv hvis oppnådd Ct-verdi er under 33. Den interne kontrollen (IC) kan i noen tilfeller vise et amplifiseringssignal. IC deteksjonen er ikke alltid nødvendig fordi et høyt antall kopieringer av målet kan gi foretrukne forsterkninger av målspesifikke nukleinsyrer.

**2** En prøve anses som negativ hvis prøven ikke viser noe amplifikasjonssignal i påvisningssystemet og den interne kontrollen er positiv (Ct er under 35). Hemming av PCR-reaksjonen kan utelukkes hvis den interne kontrollen amplifiseres. I tilfelle av uavklarte resultater (UNR), fravær av signal for intern kontroll i en negativ prøve, anbefales det å gjenta analysen i henhold til indikasjonene nedenfor.

Ved vedvarende uklare resultat anbefales det å lese gjennom bruksanvisningen og gjennomgå ekstraksjonsprosessen som benyttes av brukeren; å bekrefte riktig bruk av hvert PCR-trinn og revidere parametrene; samt kontrollere sigdformen på kurven og fluoriseringens intensitet.

MERK: Nye prøver kan testes i samme kjøring som repetisjonsprøver.

Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.

## 10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med BAL. Hvis ekspektoratprøver brukes, kan de også testes i henhold til anbefalingene over.
- Det lyofiliserte produktet må være i bunnen av røret og ikke klebet til toppområdet eller folietetningen for en vellykket utførelse. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
- Om reagensmiksturen har et stabilisert format – vanligvis lokalisert i bunnen av røret – og et utseende som er ulikt det vanlige utseendet (uten konisk form, ikke homogen, mindre/større i størrelse og/eller har en annen farge enn hvitaktig), endrer ikke dette prøvens funksjonalitet.

- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven; nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra luftveisprøver.
- Prøven er en kvalitativ test og gir ingen kvantitative verdier eller indikerer mengden av organismer i prøven.
- Ekstremt lave målenivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduseres.
- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering av prøver av mistenkt *Pneumocystis jirovecii* som inneholder høye konsentrasjoner av mål-DNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- De spesifikke kombinasjonene av primer og probe for påvisning av *mt LSU rRNA*-genet, som benyttes i VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, viser ikke signifikante kombinerte homologier med det humane genomet, human mikroflora eller andre mikroorganismer i luftveiene, som kunne resultere i forutsigbare falske positive resultater.
- Falske negative resultat kan komme av flere faktorer og kombinasjoner av disse faktorene, inkludert:
  - Feilaktig innsamling, transport, oppbevaring, og/eller håndtering av prøvematerialet.
  - Feilaktig prosedyrebehandling (inkludert DNA ekstraksjon).
  - Nedbrytning av DNA gjennom transport/oppbevaring og/eller behandling av prøvematerialet.
  - Mutasjon eller polymorfisme i primer eller probe bindingområder kan påvirke oppdagelsen av nye eller ukjente *Pneumocystis jirovecii*-stammer.
  - Organismemengden i prøvematerialet er under grensen for påvisning eller cutoff i analysen.
  - Forekomst av qPCR-hemmere eller andre typer forstyrrende substanser.
  - Instruksjonene for bruk og analyseprosedyren blir ikke fulgt.
- En positiv test indikerer ikke nødvendigvis levedyktig sopp og antyder ikke at soppene er infeksøse eller er den bakenforliggende årsaken til kliniske symptomer. Men en positiv test indikerer tilstedeværelsen av målsekvensene for *Pneumocystis jirovecii*.
- Dersom diagnostiske tester for andre respiratoriske sykdommer er negative og pasientens kliniske symptomer og epidemiologiske informasjon antyder en mulighet for infeksjon med *Pneumocystis*, bør et falskt negativt resultat vurderes og en ny testing av pasienten bør diskuteres.
- Et negativt resultat utelukker ikke tilstedeværelse av DNA fra *Pneumocystis jirovecii* i en klinisk prøve. Dersom kliniske observasjoner, pasienthistorikk og epidemiologisk informasjon antyder en infeksjon med *Pneumocystis*, bør det vurderes å utføre en ny test med økt mengde prøvevolum.
- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrekt rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

## 11. Kvalitetskontroll

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder en intern kontroll (IC) i hvert reaksjonsrør som bekrefter at teknikken fungerer som den skal.

## 12. Ytelseegenskaper

### 12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble testet ved bruk av kliniske prøver (bronkoalveolære lavager) som allerede ble karakterisert som positive eller negative for *P. jirovecii*. Resultatene var som følger:

	Sted	Prøvetype	Arbeidsflyt	Mål
1	Institute of Medical Microbiology and Virology, Technische Universität Dresden (Tyskland)	Bronkoalveolære lavager	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>P. jirovecii</i>

Tabell 7. Sted, prøvetype, arbeidsflyt og mål.

Sanne positive og negative verdier, falske positive og negative verdier, samt verdier for sensitivitet og spesifisitet for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble regnet ut i forhold til hver komparatoranalyse som vist i tabellen nedenfor:

Sted	Komparatoranalyse	Mål	TP	TN	FP	FN	Sensitivitet	Spesifisitet
1	RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR-analyse*	<i>P. jirovecii</i>	38	128	0	5	88 % (79 – 94)	100 % (98 – 100)

Tabell 8. Ekte positive (TP) og negative (TN) verdier, falske positive (FP) og negative (FN) verdier, sensitivitet, spesifisitet for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\* RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR-analyse er en kvalitativ analyse, og prøver med konsentrasjoner på  $\geq 3000$  kopier/ml ble regnet som positive

Fordi det er så viktig å fastslå riktig diagnose, ble en cutoff-verdi vurdert for å oppnå en estimering av soppmengden og således kunne skille mellom en infisert og en kolonisert pasient. Denne cutoffen var basert på referanseverdiene fra litteraturen (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) samt sensitivitets- og spesifisitetsverdier innsamlet i denne studien. En soppmengde på mer enn  $3 \times 10^4$  kopier/ml ( $C_t < 30$ ) er en høy indikasjon på pneumoni med *P. jirovecii* Pneumonia, mens en soppmengde på  $3 \times 10^3$  kopier/ml ( $C_t > 33$ ) vanligvis korresponderer med kolonisering.

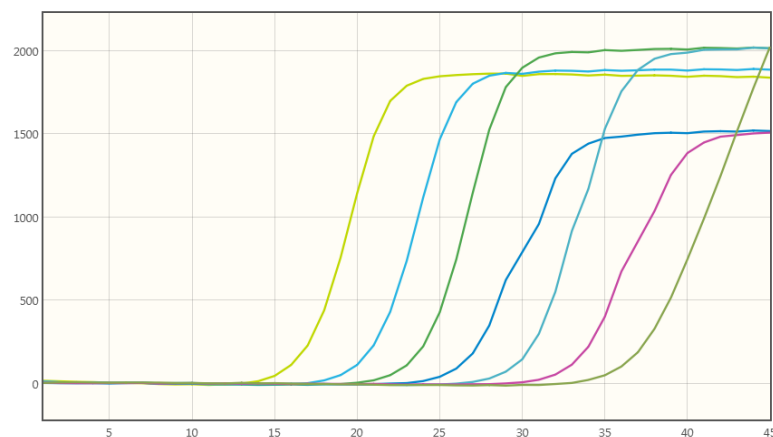
Komparatoranalysemetoden som ble brukt i den kliniske evalueringen var RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR (Altona). Denne metoden sørger for kvantifisering av soppmengden, fordi standardene for kvantifisering av *Pneumocystis jirovecii* er inkludert i hver kjøring. Av de 43 prøvene som viste en kvantifiseringsverdi på  $> 3 \times 10^3$  kopier/ml ved bruk av komparatoranalysen, 38 viste en  $C_t$ -verdi på  $< 33$  ved bruk av VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. På den annen side, viste alle prøvene som hadde en kvantifiseringsverdi på  $< 3 \times 10^3$  kopier/ml en  $C_t$ -verdi på  $> 33$  eller var negative.

Resultatet viser høyt samsvar med oppdagelse av *Pneumocystis jirovecii* ved bruk av VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en deteksjonsgrense (LoD) på 236 kopier per reaksjon for bronkoalveolære laveger (BAL-er) med en positiv rate på  $\geq 95$  %:

Figur 2. Fortynningsserie med *Pneumocystis jirovecii* ( $2,36 \cdot 10^7$  -  $2,36 \cdot 10^1$  kopier per reaksjon) kjørt på BD MAX™-systemet (kanal 475/520 (FAM)).



## 12.3. Analytisk spesifisitet

Spesifisitet for analyse av *Pneumocystis jirovecii* ble bekreftet ved testing av et panel bestående av forskjellige mikroorganismer som representerte de vanligste luftveispatogenene. Ingen kryssreaktivitet ble påvist mellom noen av de følgende testede mikroorganismene:

Testing av kryssreaktivitet					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	HHV6-stamme Z29	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Humant adenovirus, type 1–5, 8, 15, 31, 40 og 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-stamme MacIntyre	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
BK-virus type Ib-2	-	HSV-2 MS	-	<i>Listeria innocua</i> Serotype 6a/stamme CCUG 15531	-
BK-virus type IV	-	Influenzavirus A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/stamme CCUG 15528	-
Bocavirus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-lignende virus	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 1/2b	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenzavirus A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-virus	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/stamme CIP 59.53	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenzavirus A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Humant metapneumovirus A og B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-lignende virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenzavirus A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Influenzavirus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Humant parainfluenzavirus 1, 2, 3 og 4	-

Testing av kryssreaktivitet					
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenzavirus A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Parvovirus B19	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A og C	-	Influenzavirus A/Turkey/Germany/R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenzavirus A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Citomegalovirusstamme AD-169	-	Influenzavirus A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Respiratorisk syncytialt virus (RSV)	-
Humant koronavirus 229E, OC43 og NL63	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-lignende virus	-	Humant rhinovirus	-
MERS koronavirus	-	Influenzavirus B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotype Cloaca B	-	Influenzavirus B/Phuket/3073/2013	-	<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> O.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	-
Hepatitt A	-				

Tabell 9. Patogene mikroorganismer benyttet som referanse i denne studien.











## 12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten til VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble evaluert mot DNA ekstrahert fra *P. jirovecii* Type 1A, *P. jirovecii* g885652 og *P. jirovecii* j888023, som viste positive resultater.

## Bibliography/Litteratur

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/Symboler for IVD-komponenter og reagenser

 <b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>In vitro</i> -diagnostisk enhet	 Keep dry Holdes tørr	 Use by Brukes innen	 Manufacturer Produsent	 <b>LOT</b>	Batch code (Lot) Partikode (lot)
 Consult instructions for use Les bruksanvisningen	 Temperature limitation Temperaturgrenser	 Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester	 <b>UDI</b>	Unique Device Identification Unik enhetsidentifikasjon	 <b>REF</b>	Catalognumber Katalognummer

## Trademarks

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

Change Control / Endringskontroll		
Version No. / Versjon nr.	Changes / Endringer	Date / Dato
00	Original version / Original versjon.	07/02/2022
01	Typo corrections / Skrivefeilrettelser	08/03/2022
02	Format update. Section 'Transport and storage conditions' update. UDI symbol is included. / Formatoppdatering. Oppdatering av avsnittet "Transport- og lagringsforhold". UDI-symbol er inkludert.	06/06/2022

Table A 2. Control change table/ Tabell over endringskontroll.



# 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