

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Pneumocystis jirovecii
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Poniższe instrukcje obsługi odnoszą się do następującego kodu:

| PRODUCT / PRODUKT | REFERENCE / KOD |
|--|--------------------|
| 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. / Kod produktu do stosowania w systemie BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Do zestawu dołączona jest instrukcja obsługi (IFU) w wersji angielsko-hiszpańskiej.

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 / Skontaktuj się z viasure@certest.es, jeśli Twojego języka nie ma na liście.

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.

Uwaga: Użytkownik musi powiadomić wytwórcę i właściwy organ państwa członkowskiego, w którym jest ustanowiony jako użytkownik i/lub pacjent, o każdym poważnym incydencie związanym z wyrobem.

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 |

Zawartość

| | | |
|------|--|----|
| 1. | Przeznaczenie..... | 17 |
| 2. | Streszczenie i objaśnienia | 17 |
| 3. | Zasada oznaczania | 17 |
| 4. | Dostarczane odczynniki | 18 |
| 5. | Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika | 18 |
| 6. | Warunki transportu i przechowywania..... | 19 |
| 7. | Środki ostrożności dla użytkowników | 19 |
| 8. | Procedura testowa | 20 |
| 8.1. | Pobieranie, przechowywanie i transport próbek..... | 20 |
| 8.2. | Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA | 21 |
| 8.3. | Protokół PCR..... | 21 |

| | | |
|-------|---|----|
| 9. | Interpretacja wyników | 25 |
| 10. | Ograniczenia stosowania testu | 26 |
| 11. | Kontrola jakości | 28 |
| 12. | Charakterystyka wydajnościowa | 28 |
| 12.1. | Czułość i swoistość kliniczna | 28 |
| 12.2. | Czułość analityczna..... | 29 |
| 12.3. | Swoistość analityczna..... | 29 |
| 12.4. | Reaktywność analityczna | 30 |
| | Bibliography/ Bibliografia | 31 |
| | Symbols for IVD components and reagents/ Symbole dla elementów i odczynników IVD..... | 31 |
| | Trademarks..... | 31 |

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

3. Principle of the procedure

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

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

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

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

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

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

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

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

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

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

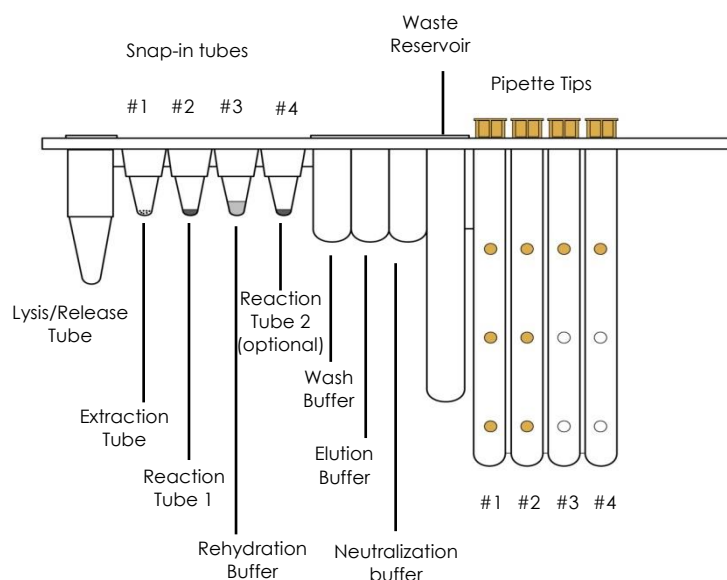
12) Click the "Save Test" button.

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, 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), 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.

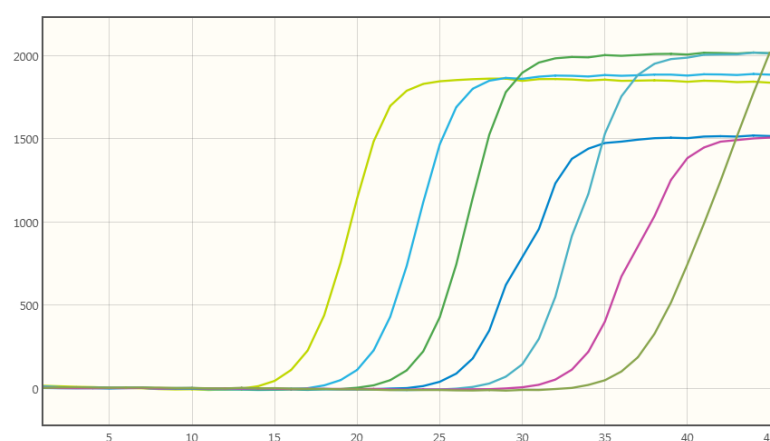
The comparator assay method used in the clinical evaluation was RealStar® Pneumocystis jirovecii PCR (Altona). This method provides quantification of the fungal load since Pneumocystis jirovecii quantification standards are included in each run. From the 43 samples that showed a quantification value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

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* (2.36×10^7 - 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.

POLSKI

1. Przeznaczenie

Zestaw VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System to automatyczny test PCR czasu rzeczywistego przeznaczony do jakościowego wykrywania DNA *Pneumocystis jirovecii* w próbkach pobranych z układu oddechowego (z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych) od pacjentów z podejrzeniem infekcji układu oddechowego postawionej przez fachowy personel medyczny (HCP). Ten test jest przeznaczony do wspomagania identyfikacji *Pneumocystis jirovecii* w połączeniu z klinicznymi objawami podmiotowymi i przedmiotowymi oraz epidemiologicznymi czynnikami ryzyka. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest system BD MAX™ System do zautomatyzowanej ekstrakcji DNA, a następnie-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z systemem BD MAX™ System. DNA z próbek z układu oddechowego jest wykrywane za pomocą sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla *Pneumocystis jirovecii*.

2. Streszczenie i objaśnienia

Zapalenie płuc wywoływane przez grzyb *Pneumocystis jirovecii* (PCP) to ostra i zagrażająca życiu choroba płuc. PCP to ważna choroba u ludzi z upośledzeniem układu odpornościowego, zwłaszcza u pacjentów z HIV, ale również u pacjentów z upośledzeniem działania układu odpornościowego z innych powodów. U osób ze zdrowym układem odpornościowym jest to niezwykle częste zakażenie utajone. Kiedyś uznawano się, że prevalencja PCP w krajach rozwijających się jest znacznie niższa, ale w toku badań wykazano, że niższa zgłaszana częstość występowania była najprawdopodobniej związana z brakiem możliwości dokładnej diagnostyki.

Objawy PCP są nieswoiste, a u pacjentów z HIV na ogół pojawiają się znacznie później, często po kilku tygodniach objawów w porównaniu do PCP skojarzonego z innymi stanami powodującymi upośledzenie funkcji układu odpornościowego. Objawy PCP obejmują następujące stany: progresywna duszność wysiłkowa, gorączka, kaszel nieproduktywny, dyskomfort w klatce piersiowej, utrata masy ciała, dreszcze i krwioplucie (rzadko).

Zdiagnozowanie PCP jest trudne w związku z powiązаныmi nieswoistymi objawami przedmiotowymi i podmiotowymi. Ponieważ nie ma możliwości namnażania *P. jirovecii* w hodowli, standardową procedurą wykrywania tego drobnoustroju jest wizualizacja mikroskopowa cyst lub postaci troficznych w próbkach pobranych z płuc z wykorzystaniem cytochemicznego lub immunofluorescencyjnego barwienia z przeciwciałami monoklonalnymi i/lub amplifikacją DNA.

3. Zasada oznaczania

Zestaw VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System jest przeznaczony do jakościowego wykrywania DNA *Pneumocystis jirovecii* w próbkach z układu oddechowego. Po izolacji DNA identyfikacji *Pneumocystis jirovecii* dokonuje się przez amplifikację konserwatywnego regionu genu rRNA z dużą podjednostką (mt LSU) przy użyciu swoistych starterów i sondy wyznakowanej barwnikiem fluorescencyjnym.

Zasada działania zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System opiera się na aktywności egzonukleazy 5' polimerazy DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowej matrycy. Ta fluorescencja jest mierzona za pomocą systemu BD MAX™ System.

Zestaw VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera w każdej probówce wszystkie elementy konieczne do oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste startery/sondy, dNTP, bufor, polimeraza) w postaci stabilizowanej oraz kontrolę wewnętrzną do monitorowania procesu ekstrakcji i/lub hamowania aktywności polimerazy.

| Element wykrywany | Kanał | Gen |
|-------------------------------|---------|---------------------------------------|
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 475/520 | Gen rRNA z dużą podjednostką (mt LSU) |
| Internal control (IC) | 530/565 | - |

Tabela 1. Element wykrywany, kanał i geny

4. Dostarczane odczynniki

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera następujące materiały i odczynniki wymienione szczegółowo w tabeli 2.:

| Odczynnik/materiał | Opis | Kod kreskowy | Ilość |
|---|---|--------------|--|
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction tube | Mieszanka enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz kontroli wewnętrznej w formacie stabilizowanym | Folia 1D | 2 woreczki po 12 przezroczystych probówek |
| Rehydration Buffer tube | Roztwór do rekonstrukcji ustabilizowanego produktu | Folia 11 | 1 woreczek z 24 przezroczystymi probówkami |

Tabela 2. Odczynniki i materiały zawarte w zestawie VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System o nr kat. VS-JIR124 (444207).

5. Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika

Poniżej wymieniono materiały i sprzęt, których użycie jest konieczne, ale które nie należą do zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: BD MAX™ System (nr ref: 441916)
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (nr kat.:442828 lub 442827).
- Kartridże do PCR BD MAX™ Cartridges (kod: 437519)
- Wirówka
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 µl)
- N-acetylo-L-cysteina (zalecana N-acetylo-L-cysteina nr kat. A7250, Merck KGaA).
- Woda niezawierająca nukleazy.
- Końcówki z filtrem
- Bezpydrowe rękawice jednorazowe.

6. Warunki transportu i przechowywania

- Zestawy można przesyłać i przechowywać w temperaturze 2–10°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie.
- Po otwarciu aluminiowych woreczków zawierających próbówki reakcyjne, produkt można zużyć w ciągu maksymalnie 24 miesiące.

7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Ten produkt jest przeznaczony do stosowania wyłącznie przez profesjonalnych użytkowników, takich jak fachowi pracownicy laboratorium lub fachowy personel medyczny i technicy, przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.
- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i (lub) materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynnika.
- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Po każdym użyciu szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników. Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na działanie produktu.
- Chronić elementy przed światłem.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium, należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, zestawu do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA-3, jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™. Należy zawsze unikać skażenia odczynników drobnoustrojami oraz rybonukleazą (RNaza) / dezoksyrybonukleazą (DNaza). Zaleca się stosowanie jałowych, wolnych od RNazy / DNazy, jednorazowych końcówek do pipet, opornych na aerozole lub końcówek do pipet wyporowych. Do każdej próbki należy stosować nową końcówkę. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i wkładami trzeba zmieniać rękawiczki (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Aby uniknąć skażenia środowiska amplikonami, nie należy rozłamywać wkładu BD MAX™ PCR Cartridge po użyciu. Zamknięcia wkładu BD MAX™ PCR Cartridge mają na celu zapobieganie skażeniu.
- Należy zaplanować przebieg pracy w jednym kierunku. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy przenosić z powrotem próbek, sprzętu i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.

- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary i maseczkę. W obszarze roboczym nie wolno jeść, pić, palić tytoniu ani nakładać środków kosmetycznych. Po zakończeniu przeprowadzania testu należy umyć ręce.
- Próbkę traktować jako potencjalnie zakaźną i/lub stanowiącą zagrożenie biologiczne, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, transportu, obsługi i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.
- Próbkę i odczynnik trzeba obsługiwać w obrębie komory laminarnej. Należy stosować środki ochrony indywidualnej (ŚOI) zgodne z aktualnie obowiązującymi wytycznymi dotyczącymi obsługi potencjalnie zakaźnych próbek. Odpady należy usuwać zgodnie z odpowiednimi przepisami miejscowymi i krajowymi.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Zgodnie z Dyrektywą KE Nr 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits nie wymagają Arkuszy Danych dotyczących Bezpieczeństwa (Safety Data Sheets) Materiału, ponieważ na podstawie deklaracji zostały zakwalifikowane jako produkty bezpieczne dla zdrowia i środowiska, jako niezawierające substancji ani mieszanin spełniających kryteria klasyfikacji substancji niebezpiecznych dostępnych w dyrektywie KE Nr 1272/2008 (CLP) lub występujących w stężeniach przekraczających wartości ustalone w wymienionych przepisach.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™ System.

8. Procedura testowa

8.1. Pobieranie, przechowywanie i transport próbek

Zestaw VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ został przetestowany z próbkami popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL, bronchoalveolar lavages). Inne rodzaje próbek muszą zostać zwalidowane przez użytkownika.

Pobieranie, przechowywanie i transport z próbek powinien odbywać się w warunkach zwalidowanych przez użytkownika. Ogólnie, w celu zapewnienia jakości testu, próbki z dróg oddechowych należy pobierać i oznaczać odpowiednio w czystych pojemnikach z podłożem transportowym lub bez podłoża (w zależności od rodzaju próbki) i przetwarzać niezwłocznie. Transport próbek musi powinien odbywać się w temperaturze 4°C przez maksymalnie 7 dni, zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów patogennych. W przypadku długotrwałego transportu (ponad 7 dni) zalecamy przesyłanie w temperaturze wynoszącej ≤-20°C. Zaleca się używanie świeżych próbek do testu. Próbkę można przechowywać w temperaturze 4°C przez maksymalnie 7 dni lub zamrożone w temperaturze -20°C lub najlepiej -80°C w celu ich konserwacji. Należy unikać cykli zamrażania i rozmrażania, aby zapobiegać degradacji próbki i kwasów nukleinowych.

Próbki pochodzące z układu oddechowego trzeba pobierać, transportować i przechowywać zgodnie z odpowiednimi wytycznymi laboratoryjnymi. Szczegółowe informacje zawierają wytyczne CDC (Specimen collection guidelines (Wytyczne dotyczące pobierania próbek). Strona internetowa <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) oraz wytyczne 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 (Poradnik dotyczący wykorzystania laboratoriów mikrobiologicznych w rozpoznawaniu chorób zakaźnych: aktualizacja z 2018 roku wydana przez Stowarzyszenie Chorób Zakaźnych Ameryki oraz Amerykańskie Stowarzyszenie na rzecz Mikrobiologii). *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

W przypadku korzystania z próbek płwociny można je testować zgodnie z poniższymi zaleceniami.

8.2. Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA

Przygotować próbkę zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkownika zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Należy pamiętać, że niektóre inne próbki mogą wymagać przetwarzania wstępnego. Procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zweryfikowane przez użytkownika.

1. Pobrać pipetą 200 µl BAL do próbówki z buforem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube i zamknąć próbkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejsć do obsługi systemu BD MAX™.
2. W przypadku próbek płwociny należy dodać do próbki acetylocysteiny (zaleca się użycie produktu N-Acetylo-L-cysteina nr kat. A7250 Merck KGaA) w stosunku 1:1 (tj. 250 µl płwociny i 250 µl acetylocysteiny o stężeniu 100 mg/ml), wymieszać, worteksując i podgrzewać przez 10 minut w temperaturze 95°C. Pobrać pipetą 200 µl wstępnie przetworzonej płwociny do próbówki BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube i zamknąć próbkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejsć do obsługi systemu BD MAX™.

8.3. Protokół PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD MAX™ System.

8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Uwaga: Jeśli użytkownik utworzył już test dla zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, można pominąć punkt 8.3.1 i przejść bezpośrednio do punktu 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” (Cykl) systemu BD MAX™ System wybrać kartę „Test Editor” (Edytor testów).
- 2) Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
- 3) Wpisać nazwę testu (tj. VIASURE *Pneumocystis jirovecii*) w oknie „Test Name” (Nazwa testu) na karcie „Basic Information” (Podstawowe informacje).
- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” (Typ ekstrakcji) wybrać „ExK TNA-3”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” (Format mieszaniny wzorcowej) wybrać „Type 5”.
 - a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX. W takiej sytuacji należy wybrać „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)”.

- 6) W „Sample extraction parameters” (Parametry ekstrakcji próbki) wybrać „User defined” (Definiowane przez użytkownika) i dopasować objętość próbki do 700 µl.
- 7) W „Ct Calculation” (Obliczenie Ct) wybrać „Call Ct at Threshold Crossing”.
- 8) W przypadku korzystania z oprogramowania w wersji 5.00 lub nowszej oraz używania oznaczonych kodem kreskowym próbek zamkniętych folią, w polu „Custom Barcodes” (Niestandardowe kody kreskowe) należy wybrać następującą konfigurację:
- Snap-In 2 Barcode (Kod kreskowy próbki 3): 1D (dotyczy próbki reakcyjnej z *Pneumocystis jirovecii* reaction tube).
 - Snap-In 3 Barcode (Kod kreskowy próbki 3): 11 (dotyczy próbki z buforem do rehydratacji Rehydration Buffer tube).
 - Snap-In 4 Barcode (Kod kreskowy próbki 4): inna próbka reaction tube (inna folia), jeżeli wybrano format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna stężona, liofilizowana mieszanina wzorcowa MM z buforem rehydratacyjnym (typ 5)) (punkt 8.3.1).
- 9) W zakładce „PCR settings”(Ustawienia PCR) wpisać następujące parametry: „Channel Settings” (Ustawienia kanału), „Gains” (Naddatek) oraz „Threshold” (Wartość progowa) (Tabela 3).
- Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX™. W takiej sytuacji Ustawienia PCR i Etapy testu należy uzupełnić dla obu pozycji 2 (zielony) oraz 4 (niebieski).

| Channel (Kanał) | Alias (Alias) | Gain (Wzmocnienie) | Threshold (Wartość progowa) | 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 |

Tabela 3. Ustawienia PCR

* Użycie klinicznej wartości progowej na poziomie Ct 33 w tym systemie testowym (co jest równoważne 3000 kopiom na ml) umożliwi odróżnianie wysokiego i niskiego obciążenia grzybiczego, co oznacza zapewnienie cennych informacji umożliwiających odróżnienie pacjentów z zakażeniem oraz kolonizacją. Tę wartość odcinającą opracowano na podstawie wartości referencyjnych pozyskanych z piśmiennictwa oraz wartości czułości i swoistości pozyskanych podczas klinicznej oceny produktu. Patrz sekcja 12. Charakterystyka wydajnościowa.

Uwaga: Zaleca się ustawianie dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej jako punktu startowego, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartości progowe dla różnych instrumentów mogą być różne ze względu na różne intensywności sygnału.

- 10) Na karcie „PCR settings” (Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Przesłuch widmowy) (tabela 4.).

| | | False Receiving Channel (Falszywy kanał odbiorczy) | | | | |
|---------------------------------------|---------|--|---------|---------|---------|---------|
| Channel (Kanał) | | 475/520 | 530/565 | 585/630 | 630/665 | 680/715 |
| Excitation Channel (Kanał wzbudzenia) | 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 | - |

Tabela 4. Parametry „Spectral cross-talk”

11) W zakładce „Test Steps” (Etapy testu) wpisać protokół PCR (Tabela 5)

| Step Name (Nazwa etapu) | Profile Type (Typ profilu) | Cycles (Cykle) | Time (s) (Czas(y)) | Temperature (Temperatura) | Detect (Wykrywanie) |
|---|----------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Initial denaturation (Wstępna denaturacja) | Wstrzymanie | 1 | 120 | 98°C | - |
| Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (gromadzenie danych)) | 2- Temperatura | 45 | 10 | 95°C | - |
| | | | 41 | 63°C | ✓ |

Tabela 5. Protokół PCR

12) Kliknąć przycisk „Save test” (Zapisz test).

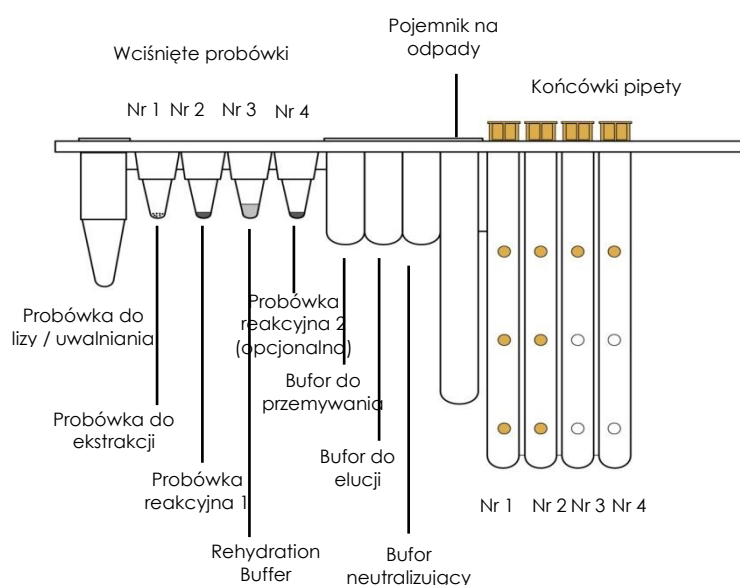
8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

- Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi należy wyjąć jeden Unitized Reagent Strips (indywidualny pasek odczynnikowy) z zestawu BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Delikatnie stuknąć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie próbek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™ System.
- Wyjąć potrzebną liczbę próbek do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (biała folia) z saszetki ochronnej. Wcisnąć próbkę (próbki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w pasku TNA (Pozycja 1, biały kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- Określić i oddzielić odpowiednią liczbę próbek reakcyjnych *Pneumocystis jirovecii* reaction tubes (folia 1D) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja 2, zielony kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.)
 - Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
 - Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie próbki i nie przylega do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbki.
 - Uwaga: Jeśli użytkownik wybrał format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)) (Punkt 8.3.1), należy określić i oddzielić odpowiednią liczbę dodatkowych próbek reakcyjnych VIASURE (inna folia) i wcisnąć

je w odpowiednie miejsca w pasku (pozycja 4, niebieski kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.

- 4) Wyjąć potrzebną liczbę próbek Rehydration Buffer tube (folia 11) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja 3, brak koloru kodowego na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
 - a. Aby zapewnić prawidłowy transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie próbówki i nie przylega do górnej powierzchni próbówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że bufor znajduje się na spodzie próbówki.

Rysunek 1. Listwa odczynnikowa BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Ustawienie przyrządu BD MAX™

- 1) Wybrać kartę „Work list” (Lista robocza) na ekranie „Run” (Cykl) oprogramowania systemu BD MAX™ System w.4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać VIASURE *Pneumocystis jirovecii* (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz Punkt 8.3.1).
- 3) Wybrać odpowiedni numer serii zestawu (można go znaleźć na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) z rozwijanego menu (opcjonalnie).
- 4) Wpisać numer identyfikacyjny Sample Buffer Tube (próbówki z buforem próbki) do okna „Sample tube” (Probówka z próbką) w ramach „Worklist” (Listy roboczej), skanując kod paskowy skanerem lub wpisując ręcznie.
- 5) Wpisać identyfikator próbki lub pacjenta i (lub) okno „Accession” w ramach „Work List” (Listy roboczej) i kliknąć przycisk „Save” (Zapisz). Kontynuować aż do wpisania wszystkich Sample Buffer Tubes (próbek z buforem próbki). Upewnić się, że identyfikator próbki lub pacjenta oraz Sample Buffer Tubes (próbówki z buforem próbki) zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną Sample Buffer Tube (próbówkę z buforem próbki) w statywie (statywach) BD MAX™ Rack(s).
- 7) Załadować statyw (statywy) do systemu BD MAX™ System (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™ System, a statyw B – po prawej).

- 8) Włożyć potrzebną liczbę wkładów BD MAX™ PCR Cartridge(s) do systemu BD MAX™ System.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™ System.
- 10) Kliknąć „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby rozpocząć procedurę.

8.3.4. Raport BD MAX™

- 1) W menu głównym kliknąć przycisk „Results” (Wyniki).
- 2) Kliknąć dwukrotnie na swoim cyklu na liście lub wcisnąć przycisk „View” (Wyświetl).
- 3) Kliknąć „Print” (Drukuj), wybrać: „Run Details, Test Details and Plot...” (Szczegóły Cyklu, Szczegóły Testu i wykres...).
- 4) Kliknąć przycisk „Print or Export” (Drukuj lub eksportuj) na ekranie „Run Reports” (Raporty cyklu).

9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™ System.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 3). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” musi zostać sprawdzona ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji, który spełniałby wprowadzone kryteria.
- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w korelacji z krzywą amplifikacji i zgodnie z wytycznymi interpretacji próbki streszczonymi w Tabeli 6.

Należy sprawdzić sygnał kontroli wewnętrznej, aby sprawdzić, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™ System.

Wyniki należy odczytywać i analizować za pomocą poniższej tabeli:

| <i>Pneumocystis jirovecii</i> (475/520) | Kontrola wewnętrzna (530/565) | Interpretacja |
|---|-------------------------------|---|
| + | +/- ¹ | Wykryto DNA <i>Pneumocystis jirovecii</i>¹ |
| - | + ² | Nie wykryto DNA <i>Pneumocystis jirovecii</i>² |
| - | - ² | Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji.² |
| IND | IND | Nieokreślony wynik oznaczenia (IND, ang. Indeterminate). Awaria systemu BD MAX™ System. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia. |
| INC | INC | Niepełny wynik oznaczenia (INC, ang. Incomplete). Awaria systemu BD MAX™ System. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń. |

Tabela 6. Interpretacja próbki.

+: Amplifikacja wystąpiła

-: Amplifikacja nie wystąpiła.

1 Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest mniejsza niż 33. Kontrola wewnętrzna (IC) może wykazywać sygnał amplifikacji lub go nie wykazywać. Czasami wykrywanie kontroli wewnętrznej (IC) nie jest konieczne ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej.

2 Uznaje się, że próbka dała wynik ujemny, jeśli próbka nie wykazuje sygnału amplifikacji w systemie detekcji, ale kontrola wewnętrzna jest dodatnia (wartość Ct jest mniejsza niż 35). Hamowanie reakcji PCR można wykluczyć za pomocą amplifikacji kontroli wewnętrznej. W przypadku wyników nierozstrzygających (UNR), braku sygnału kontroli wewnętrznej w próbce, która dała wynik ujemny, zalecamy powtórzenie próby według podanych poniżej wskazań.

W przypadku ponownego uzyskania dwuznacznego wyniku zaleca się ponownie zapoznać się z instrukcją użycia i przeanalizować proces izolacji stosowany przez użytkownika w celu zweryfikowania prawidłowości wykonywania każdego etapu reakcji PCR oraz sprawdzenia parametrów. Należy również sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji.

UWAGA: Nowe próbki można testować w tym samym cyklu z próbkami, których test się powtarza.

Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.

10. Ograniczenia stosowania testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.
- Choć ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go w odniesieniu do BAL. Ponadto, w przypadku korzystania z próbek płwociny można je testować zgodnie z powyższymi zaleceniami.

- Aby zapewnić dobrą wydajność testu, liofilizowany produkt powinien znajdować się na spodzie próbki, a nie przylegać do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbki.
- Na ogół występujący na spodzie próbki inny od standardowego wygląd mieszaniny reakcyjnej w formie stabilnym (bez kształtu stożkowego, niejednorodny, mniejszy/większy i/lub w kolorze innym od białawego) nie ma wpływu na funkcjonalność testu.
- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczne jest wyekstrahowanie właściwego kwasu nukleinowego z próbek z dróg oddechowych.
- Jest to test jakościowy i nie zapewnia on wartości ilościowych ani nie wskazuje liczby obecnych drobnoustrojów.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez próbki podejrzane o obecność *Pneumocystis jirovecii* zawierające wysokie stężenia docelowej sekwencji DNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Swoiste kombinacje starterów i sond do wykrywania genu mt LSU rRNA wykorzystane w zestawie VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nie wykazuje znaczących kombinowanych homologii z ludzkim genomem, ludzką mikroflorą, wirusem lub innymi drobnoustrojami układu oddechowego, co mogłoby prowadzić do przewidywalnych wyników fałszywie dodatnich.
- Wyniki fałszywie ujemne mogą wynikać z kilku czynników oraz ich kombinacji, w tym z powodu:
 - nieprawidłowego pobierania, transportu, przechowywania i/lub metod przechowywania próbek.
 - nieprawidłowych procedur przetwarzania (w tym izolacji DNA).
 - DNA podczas transportu/przechowywania i/lub przetwarzania próbki.
 - mutacji lub polimorfizmów w regionach wiązania startera lub sondy, które mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanych szczepów *Pneumocystis jirovecii*.
 - Liczba drobnoustrojów w próbce poniżej granicy wykrywania lub wartości odcinającej testu.
 - obecności inhibitorów reakcji qPCR albo innych typów substancji interferujących.
 - nieprzestrzegania instrukcji użycia i procedury przeprowadzania testu.
- Wynik dodatni testu nie musi koniecznie oznaczać obecności żywych grzybów i nie sugeruje, że te grzyby są zakaźne czy też są przyczyną objawów klinicznych. Jednakże wynik dodatni wskazuje na obecność docelowych sekwencji *Pneumocystis jirovecii*.
- Jeśli badania diagnostyczne pod kątem innych chorób układu oddechowego są ujemne, a objawy kliniczne pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują możliwość zakażenia *Pneumocystis*, wówczas należy wziąć pod uwagę wynik fałszywie ujemny i rozważyć ponowne wykonanie testu.
- Ujemny wynik nie wyklucza obecności DNA *Pneumocystis jirovecii* w próbce klinicznej. Jeśli obserwacje kliniczne, wywiad pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują zakażenie *Pneumocystis*, należy rozważyć ponowne wykonanie badania próbki o zwiększonej objętości.
- W przypadku uzyskania wyników nierozstrzygujących, nieokreślonych lub niepełnych przy użyciu zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System konieczne będzie powtórzenie testu. Wyniki nierozstrzygujące mogą być skutkiem obecności inhibitorów w próbce lub niewłaściwej rehydratacji w próbce z liofilizowaną mieszaniną reakcyjną. W razie awarii urządzenia uzyskuje się wyniki nieokreślone lub niepełne.

11. Kontrola jakości

Zestaw VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera kontrolę wewnętrzną (IC) w każdej próbce reakcyjnej, potwierdzającą prawidłowe zastosowanie techniki.

12. Charakterystyka wydajnościowa

12.1. Czulość i swoistość kliniczna

Wydajność kliniczną zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System przetestowano przy użyciu próbek klinicznych (popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych), które wcześniej scharakteryzowano jako dodatnie lub ujemne w zakresie obecności *P. jirovecii*. Uzyskano następujące wyniki:

| | Ośrodek | Rodzaj próbki | Przebieg działań | Element wykrywany |
|---|---|--|---|---------------------|
| 1 | Instytut Mikrobiologii Medycznej i Wirusologii, Technische Universität Dresden (Niemcy) | Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) | BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System | <i>P. jirovecii</i> |

Tabela 7. Ośrodek, rodzaj próbki, przebieg pracy i cel

Wartości prawdziwie dodatnie i ujemne, wartości fałszywie dodatnie i ujemne, wartości czulości i swoistości dla zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System obliczono w odniesieniu do każdej analizy porównawczej w sposób przedstawiony w poniższej tabeli:

| Ośrodek | Test porównawczy | Element wykrywany | TP | TN | FP | FN | Czulość | Swoistość |
|---------|---|---------------------|----|-----|----|----|-------------|---------------|
| 1 | Test RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR assay* | <i>P. jirovecii</i> | 38 | 128 | 0 | 5 | 88% (79–94) | 100% (98–100) |

Tabela 8. Wartości prawdziwie dodatnie i ujemne, wartości fałszywie dodatnie i ujemne, wartości czulości i swoistości, wartości dla zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* Test RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR assay to test jakościowy. Za dodatnie uznawano próbki ze stężeniem ≥ 3000 kopii/ml

Ze względu na istotność postawienia prawidłowego rozpoznania, rozważano wartość odcinającą, aby uzyskać oszacowanie obciążenia grzybiczego i umożliwić odróżnianie pacjentów zakażonych i skolonizowanych. Tę wartość odcinającą wybrano na podstawie wartości referencyjnych pozyskanych z piśmiennictwa (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) oraz na podstawie wartości czulości i swoistości uzyskanych w toku tego badania klinicznego. Obciążenie grzybicze wyższe niż 3×10^4 kopii/ml ($C_t < 30$) zdecydowanie sugeruje zapalenie płuc wywołane przez *P. jirovecii*, natomiast wartość poniżej 3×10^3 kopii/ml ($C_t > 33$) na ogół odpowiada kolonizacji.

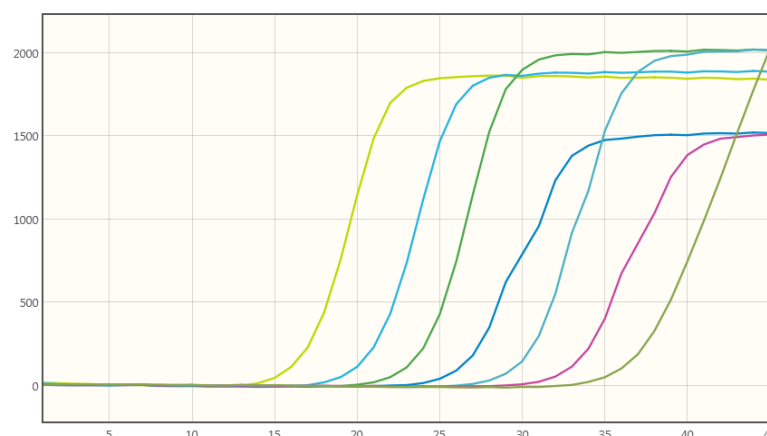
Testem porównawczym zastosowanym do oceny klinicznej był test RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR (Altona). Ta metoda umożliwia kwantyfikację obciążenia grzybiczego, gdyż w każdej serii oznaczeń uwzględnione są wzorce kwantyfikacji *Pneumocystis jirovecii*. Z 43 próbek z wartością kwantyfikacji $> 3 \times 10^3$ kopii/ml w teście porównawczym, w 38 przypadkach uzyskano wartość $C_t < 33$ przy użyciu zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Z drugiej strony wszystkie próbki z wartością kwantyfikacji $< 3 \times 10^3$ kopii/ml dały wartość C_t value > 33 lub wynik ujemny.

Wyniki wykazują zgodność w zakresie wykrywania *Pneumocystis jirovecii* przy użyciu zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Czulość analityczna

Zestaw VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a ma granicę wykrywalności (LoD) na poziomie 236 kopii na reakcję z użyciem popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) przy częstotliwości wyników dodatnich wynoszącą $\geq 95\%$:

Rysunek 2. Rozcieńczenia seryjne dla serii oznaczeń matrycy *Pneumocystis jirovecii* ($2,36 \cdot 10^7$ - $2,36 \cdot 10^1$ kopii na reakcję) na systemie BD MAX™ System (kanał 475/520 (FAM)).



12.3. Swoistość analityczna

Swoistość oznaczenia *Pneumocystis jirovecii* potwierdzono, badając panel składający się z różnych mikroorganizmów reprezentujących najczęściej występujące patogeny zakażeń dróg oddechowych. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w odniesieniu do żadnego z następujących przebadanych mikroorganizmów:

| Badania reaktywności krzyżowej | | | | | |
|--|---|--|---|---|---|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | - | HHV6, szczep Z29 | - | <i>Legionella dumoffii</i> | - |
| Ludzki adenowirus typu 1-5, 8, 15, 31, 40 i 41 | - | HHV6 typ A | - | <i>Legionella longbeachae</i> | - |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | - | HHV6 typ B | - | <i>Legionella micdadei</i> | - |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | - | HSV-1, szczep MacIntyre | - | <i>Legionella pneumophila</i> | - |
| Wirus BK, typ Ib-2 | - | HSV-2 MS | - | <i>Listeria innocua</i> serotyp 6a/szczep CCUG 15531 | - |
| Wirus BK, typ IV | - | Wirus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) | - | <i>Listeria ivanovii</i> serowar 5/szczep CCUG 15528 | - |
| Bokawirus | - | Wirus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 | - | <i>Listeria monocytogenes</i> serotyp 1/2b | - |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | - | Wirus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 | - | <i>Listeria monocytogenes</i> serowar 4b/szczep CIP 59.53 | - |
| <i>Bordetella holmesii</i> | - | Wirus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 | - | Ludzki metapneumowirus A i B | - |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | - | Wirus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) | - | <i>Moraxella catarrhalis</i> | - |

| Badania reaktywności krzyżowej | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|
| <i>Bordetella pertussis</i> | - | Wirus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) | - | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | - |
| <i>Candida albicans</i> | - | Wirus Influenza A/Szwajcaria/9715293/2013 (H3N2) | - | Ludzkie wirusy paragrypy 1, 2, 3 i 4 | - |
| <i>Chlamydia caviae</i> | - | Wirus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) | - | Parwowirus B19 | - |
| <i>Chlamydia psittaci</i> genotyp A i C | - | Wirus Influenza A/Turcja/Niemcy R2485+86/2014 (H5N8) | - | <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 | - |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | - | Wirus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) | - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - |
| Cytomegalowirus, szczep AD-169 | - | Wirus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) | - | Ludzki wirus syncytialny dróg oddechowych (RSV) | - |
| Ludzki koronawirus 229E, OC43 i NL63 | - | Wirus Influenza B/Brisbane/60/2008 | - | Ludzki rhinovirus | - |
| Koronawirus MERS | - | Wirus Influenza B/Florida/04/06 | - | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | - |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> serotyp Cloaca B | - | Wirus Influenza B/Phuket/3073/2013 | - | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> serotyp Cloaca A | - | Wirus JC, typ 1A | - | <i>Toxoplasma gondii</i> typ II | - |
| Wirus Epsteina-Barra | - | Wirus JC, typ 2B | - | <i>Treponema pallidum</i> | - |
| <i>Escherichia coli</i> O.1285;O18:H7:K1 | - | <i>Klebsiella oxytoca</i> | - | Wirus opryszczki i ospy wietrznej, Ellen | - |
| <i>Haemophilus influenzae</i> MinnA | - | <i>Legionella bozemanii</i> | - | <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 | - |
| Wirus wirusowego zapalenia wątroby typu A | - | | | | |

Tabela 9. Referencyjne patogenne mikroorganizmy używane w tym badaniu.











12.4. Reaktywność analityczna

Reaktywność zestawu VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System oceniano przy użyciu DNA wyodrębnionego z *P. jirovecii* typ 1A, *P. jirovecii* g885652 i *P. jirovecii* j888023, z uzyskaniem wyników dodatnich.

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/ Symbole dla elementów i odczynników IVD

| | | | | |
|--|--|---|--|--|
|  Urządzenie do diagnostyki w warunkach <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> diagnostic device |  Przechowywać w suchym miejscu Keep dry |  Użyć przed Use by |  Producent Manufacturer |  Kod partii (seria) Batch code (Lot) |
|  Zapoznać się z instrukcją obsługi. Consult instructions for use |  Ograniczenie temperatury Temperature limitation |  Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów Contains sufficient for <n> test |  Unique Device Identification Unikalna identyfikacja urządzenia |  Numer katalogowy Catalog number |

Trademarks

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

| Change Control / Kontrola zmian | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|-------------|
| Version No. / Wersja nr | Changes / Zmiany | Date / Data |
| 00 | Original version / Wersja oryginalna. | 06/06/2022 |

Table A 2. Control change table/ Tableau de contrôle des modifications.

Revision : 6th June 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev02