

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Pneumocystis jirovecii
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:

PRODUCT / PRODUTO	REFERENCE / REFERÊNCIA
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. / Referência do produto a usar com o BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version. / O kit contém as instruções de utilização (IDU) na versão em inglês/espanhol.

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 / Contacte con viasure@certest.es si su idioma no está en la lista.

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

Nota: O utilizador deve notificar o fabricante e as autoridades competentes do Estado-Membro no qual está estabelecido como utilizador e/ou paciente de qualquer incidente grave relacionado com o produto.

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.....	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity.....	15
12.2.	Analytical sensitivity	16
12.3.	Analytical specificity.....	16
12.4.	Analytical reactivity	17

Índice

1.	Utilização prevista	18
2.	Introdução e explicação	18
3.	Princípio do procedimento	18
4.	Reagentes fornecidos	19
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	19
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	20
7.	Precauções para o utilizador.....	20
8.	Procedimento do teste	21
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras	21
8.2.	Preparação da amostra e extração de ADN	22
8.3.	Protocolo de PCR.....	22

9.	Interpretação dos resultados.....	26
10.	Limitações do teste.....	27
11.	Controlo de qualidade	29
12.	Características do teste	29
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica	29
12.2.	Sensibilidade analítica.....	30
12.3.	Especificidade analítica.....	30
12.4.	Reatividade analítica	31
	Bibliography/ Bibliografia	32
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes	32
	Trademarks.....	32

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 ≤ -20°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.

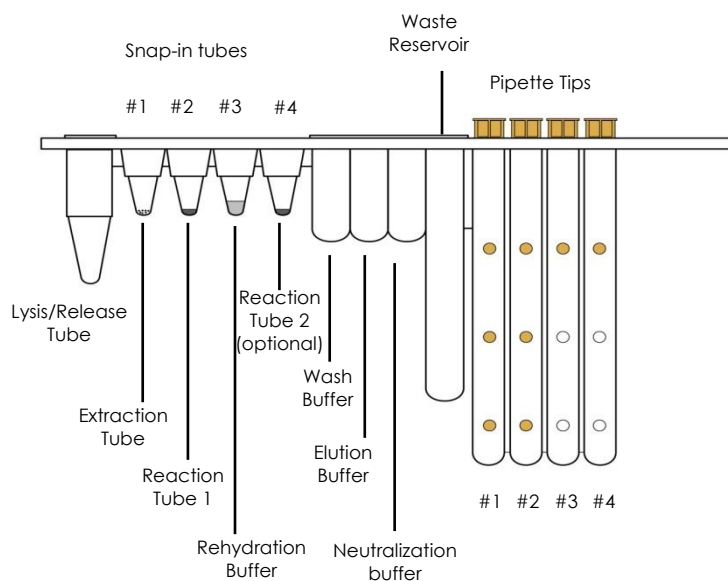
12) Click the "Save Test" button.

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 (1I 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; properly 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* target 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, Hasseine 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.

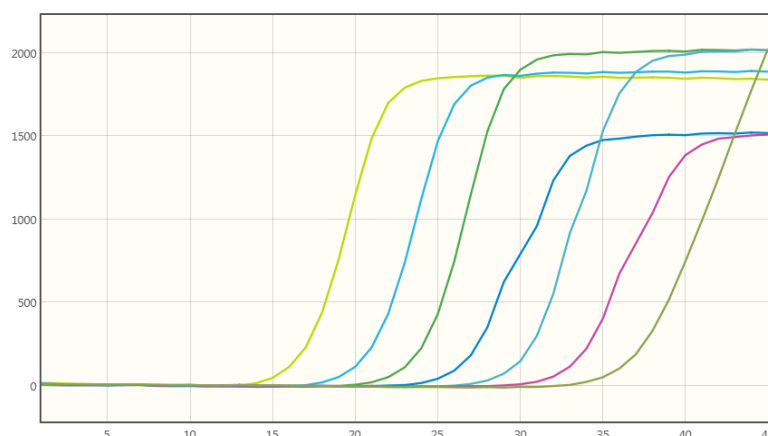
The comparator assay method used in the clinical evaluation was RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR (Altona). This method provides quantification of the fungal load since *Pneumocystis jirovecii* quantification standards are included in each run. From the 43 samples that showed a quantification value $> 3 \times 10^3$ 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	-	Parvovirus B19	-

Cross-reactivity testing					
		Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus			
<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.

PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System consiste num teste de PCR em tempo real automatizado concebido para a deteção qualitativa de ADN de *Pneumocystis jirovecii* em amostras respiratórias (lavagem broncoalveolar) de doentes com suspeita de infeção respiratória pelo profissional de saúde (PS). Este teste destina-se a ser utilizado como um auxiliar na identificação de *Pneumocystis jirovecii* em combinação com os sinais e sintomas clínicos do doente e fatores de risco epidemiológico. O ensaio usa o BD MAX™ System para a extração automatizada de ADN e posterior PCR em tempo real, usando os reagentes fornecidos combinados com os reagentes universais e materiais descartáveis para o BD MAX™. O ADN de amostras respiratórias é detetado utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para *Pneumocystis jirovecii*.

2. Introdução e explicação

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PCP) é uma doença pulmonar aguda e potencialmente fatal causada pelo fungo *Pneumocystis jirovecii*. A PCP é uma doença importante em humanos imunocomprometidos, em particular doentes portadores do VIH, mas também em doentes cujo sistema imunitário se encontra severamente suprimido por outros motivos. Em humanos com um sistema imunitário normal, é uma infeção silenciosa extremamente frequente. Em regiões em desenvolvimento do mundo, considerava-se anteriormente que a prevalência de PCP era muito mais baixa, mas estudos demonstraram que a baixa incidência notificada se deve, provavelmente, à incapacidade de diagnosticar com exatidão a doença.

Os sintomas de PCP são não específicos e, em doentes portadores do VIH, tendem a surgir muito mais tarde, ao fim de várias semanas de sintomas, comparativamente com a PCP associada a outras condições imunossupressoras. Os sintomas de PCP incluem os seguintes: dispneia de esforço progressiva, febre, tosse seca, desconforto torácico, perda de peso, arrepios e hemoptise (rara).

A PCP é difícil de diagnosticar em resultado dos sinais e sintomas não específicos associados. Como não é possível propagar o *P. jirovecii* em cultura, a visualização microscópica de cistos ou formas tróficas em espécimes pulmonares, utilizando coloração citoquímica ou imunofluorescente com anticorpos monoclonais e/ou amplificação de ADN, constituem os procedimentos padrão para detetar este microrganismo.

3. Princípio do procedimento

O VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para a deteção qualitativa de ADN de *Pneumocystis jirovecii* em amostras respiratórias. Após o isolamento de ADN, a identificação de *Pneumocystis jirovecii* é levada a cabo pela amplificação de uma região conservada do gene rARN da subunidade grande (mt LSU), utilizando oligonucleótidos específicos e uma sonda marcada com fluorescência.

O VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseia-se na atividade da 5' exonuclease da polimerase do ADN. Durante a amplificação do ADN, esta enzima hidrolisa a sonda ligada à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade do modelo alvo. Esta fluorescência é monitorizada no BD MAX™ System.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para o ensaio de PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase) num formato estabilizado, bem como um controlo interno para a monitorização do processo de extração e/ou inibição da atividade da polimerase.

Alvo	Canal	Gene
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	475/520	Subunidade grande (mt LSU) do gene ARNr
Controlo interno (CI)	530/565	-

Tabela 10. Alvo, canais e genes.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Código de barras	Quantidade
<i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction tube	Uma mistura de enzimas, oligonucleótidos/sondas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno em formato estabilizado.	Selo 1D	2 envelopes de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Selo 11	1 envelope de 24 tubos transparentes

Tabela 11. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com Ref.^a VS-JIR124 (444207).

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A lista seguinte inclui os materiais e o equipamento que são necessários para a utilização mas não estão incluídos no VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442828 ou 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e1000 µl).
- N-Acetil-L-cisteína (N-Acetil-L-cisteína recomendada: Ref.^a A7250, Merck KGaA).
- Água sem nuclease
- Pontas com filtro.
- Luvas descartáveis sem pó.

6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contêm os tubos de reação, o produto pode ser utilizado por um período máximo de 24 meses.

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais de saúde e técnicos de laboratório, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.
- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os tubos de reação com o fecho zip imediatamente depois de cada utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.
- Nos casos em que sejam realizados outros testes de PCR na mesma área geral do laboratório, deve proceder com cuidado para garantir que o VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, o kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-3 e quaisquer reagentes adicionais requeridos para o teste e o BD MAX™ System não são contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos (BD MAX™ PCR Cartridge).
- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o BD MAX™ PCR Cartridge após a utilização. Os selos do BD MAX™ PCR Cartridge foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.

- Seguir as boas práticas do laboratório. Usar vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos de cosmética na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o teste.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas e/ou com risco biológico, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e devem ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tomar as precauções necessárias durante a colheita, transporte, armazenamento, tratamento e eliminação de amostras.
- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infecciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1907/2006 (REACH), os VIASURE Real Time PCR Detection Kits não requerem Fichas de Dados de Segurança do Material (Safety Data Sheets) tendo em conta a sua classificação como não perigosos para a saúde e para o ambiente, pois não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de risco disponíveis no Regulamento (CE) N.º 1272/2008 (CLP) ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a respetiva declaração.
- Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

8. Procedimento do teste

8.1. Colheita, armazenamento e transporte de amostras

O VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado em lavagens broncoalveolares (BAL). Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

Para a colheita, armazenamento e transporte de espécimes devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. Em geral, as amostras respiratórias devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra), e processadas com a maior brevidade possível para garantir a qualidade do teste. As amostras devem ser transportadas a 4 °C durante um período máximo de 7 dias, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais para o transporte de material patogénico. Para transportes de longa duração (mais de 7 dias), é recomendado o envio a uma temperatura ≤ -20 °C ou inferior. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas a 4 °C por um período máximo de 7 dias, ou podem ser congeladas a -20 °C ou, idealmente, a -80 °C, para conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

As amostras respiratórias têm de ser colhidas, transportadas e armazenadas de acordo com diretrizes laboratoriais apropriadas. Para mais informações, consultar as orientações do CDC (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) e as orientações da

IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

Se forem usadas amostras de expetoração, podem ser testadas de acordo com as recomendações citadas abaixo.

8.2. Preparação da amostra e extração de ADN

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Ter em conta que outras amostras podem requerer pré-processamento. A utilização de outros procedimentos de preparação e extração específicos deve ser validada pelo utilizador.

1. Pipete 200 µl de BAL para um tubo com tampão de amostra BD MAX™ ExK™ TNA-3 e feche o tubo com uma tampa septada. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.
2. Para amostras de expetoração, adicione acetilcisteína (N-Acetil-L-cisteína recomendada: Ref.º A7250, Merck KGaA) à amostra numa relação de 1:1 (ou seja, 250 µl de expetoração e 250 µl de acetilcisteína 100 mg/ml), misture por vórtex e aqueça a 95 °C durante 10 minutos. Pipete 200 µl da expetoração pré-tratada num tubo de tampão de amostra BD MAX™ ExK™ TNA-3 e feche o tubo com uma tampa septada. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocolo de PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter instruções mais detalhadas.

8.3.1. Criação de um programa de teste de PCR para o VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Caso já tenha criado o teste para o VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, pode saltar o passo 8.3.1 e ir diretamente para o 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do BD MAX™ System, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) No separador Informações básicas, na janela "Test Name" (Nome do teste), dê um nome ao seu teste: ou seja, VIASURE *Pneumocystis jirovecii*.
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolha "Type 5" (Tipo 5).

- a. Nota: O produto pode ser usado em combinação com um VIASURE for BD MAX test adicional, em seguida, selecione "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM com tampão de reidratação (tipo 5)).
- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) selecionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume para 700 µl.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Caso seja executado o software versão 5.00 ou mais recente e tenha lido o código de barras de tubos de encaixe de folha, no separador "Custom Barcodes" (Códigos de barras personalizados) selecione a configuração seguinte:
- "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): 1D (relativo ao tubo de reação *Pneumocystis jirovecii*)
 - "Snap-In 3 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).
 - "Snap-In 4 Barcode" (Código de barras do encaixe 4): outro tubo de reação (selo diferente), se optar por usar o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM com tampão de reidratação (tipo 5) (secção 8.3.1).
- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 3).
- a. Nota: O produto pode ser usado em combinação com um teste VIASURE for BD MAX™ adicional, e deve efetuar os passos de definições e teste da PCR para as posições de encaixe 2 (verde) e encaixe 4 (azul).

Canal	Alíás (Alíás)	Ganho	Limiar	Ct Min.	Ct Max.
475/520 (FAM)	<i>P. jirovecii</i>	50	200	0	33*
530/565 (HEX)	Cl	80	200	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 12. "PCR settings" (Definições de PCR).

* A utilização de um limite clínico de Ct 33 neste sistema de teste (equivalendo a 3000 copias/ml) permite distinguir entre carga fúngica elevada e baixa, e, consequentemente, proporciona informações valiosas que ajudam a diferenciar entre um doente infetado e um doente colonizado. Este valor de corte (cut off) baseou-se nos valores de referência obtidos a partir da literatura, bem como nos valores de sensibilidade e especificidade obtidos na avaliação clínica do produto. Consultar a Secção 12. Características de desempenho.

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 10) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral) (Tabela 4).

		Canal receptor falso				
		Canal	475/520	530/565	585/630	630/665
Canal de excitação	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 13. "Spectral cross-talk parameters" (Parâmetros de interação espectral).

11) No separador "Test Steps" (Passos de teste), introduzir o protocolo de PCR (Tabela 5).

Nome do passo	Tipo de perfil	Ciclos	Tempo (s)	Temperatura	Deteção
Desnaturação inicial	Retenção	1	120	98 °C	-
Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados)	2-Temperatura	45	10	95 °C	-
			41	63 °C	✓

Tabela 14. Protocolo de PCR.

12) Clicar no botão "Save Test" (Guardar teste).

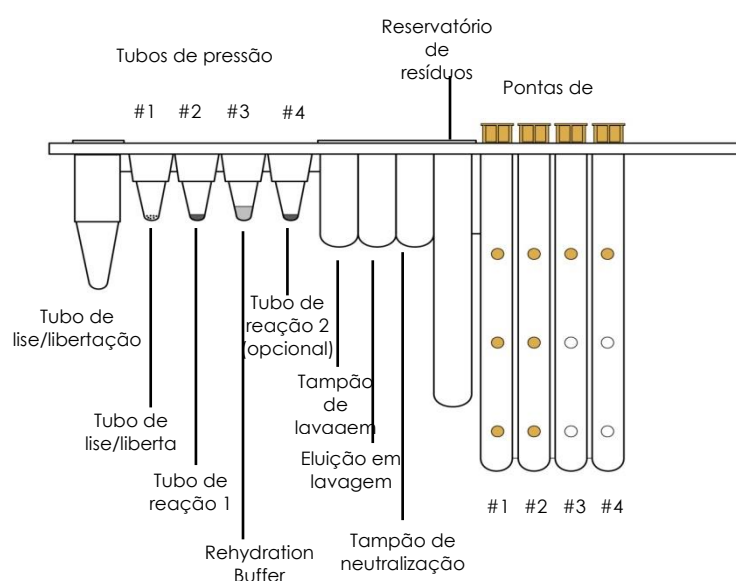
8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System

- Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual (Unitized Reagent Strips) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do BD MAX™ System.
- Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- Determine e separe o número apropriado de tubos de reação de *Pneumocystis jirovecii* (folha 1D) e encaixe-os nas posições correspondentes na tira (posição de encaixe 2, código de cor verde no suporte. Ver Figura 1).
 - Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
 - Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes VIASURE adicionais (selo diferente) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição 4, código de cor azul no

suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.

- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer Tube (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
 - a. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

Figura 1. Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do BD MAX™ System.
- 2) No menu pendente "Test" (Teste), selecione VIASURE *Pneumocystis jirovecii* (se ainda não tiver sido criado, consulte a Secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação do Sample Buffer Tube na janela "Sample tube" (Tubo de amostra) no separador "Work List" (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através de introdução manual.
- 5) Preencher a janela "Specimen/Patient ID" (ID de amostra/doente) e "Accession" (Acesso) do separador "Work list" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continuar até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra (Sample Buffer Tubes). Certificar-se de que a identificação da amostra/doente e os Sample Buffer Tube estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o tampão de amostra (Sample Buffer Tube) preparado no(s) BD MAX™ Rack(s) (suportes para tubos do BD MAX™ System).

- 7) Colocar o(s) suporte(s) no BD MAX™ System (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do BD MAX™ System e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge no BD MAX™ System.
- 9) Fechar a porta do BD MAX™ System.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clicar no botão "Results" (Resultados).
- 2) Fazer duplo clique no teste incluído na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view" (Visualizar).
- 3) Clicar no botão "Print" (Imprimir), selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalhes da execução, detalhes do teste e gráfico...).
- 4) Clicar no botão "Print" (Imprimir) ou "Export" (Exportar) no ecrã "Run Reports" (Relatórios da execução).

9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do BD MAX™ System disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 3). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- O valor de Ct de -1 indica que não ocorreu um processo de amplificação que satisfaz os critérios definidos.
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 6.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do BD MAX™ System.

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (475/520)	Controlo interno (530/565)	Interpretação
+	+/- ¹	ADN de <i>Pneumocystis jirovecii</i> detetado ¹
-	+ ²	ADN de <i>Pneumocystis jirovecii</i> não detetado ²
-	- ²	Resultado não resolvido (UNR) Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra.²
IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 15. Interpretação da amostra.

+ : Houve amplificação.

- : Não houve amplificação.

1 Uma amostra é considerada positiva se o valor Ct obtido for inferior a 33. O controlo interno (CI) poderá mostrar ou não um sinal de amplificação. Por vezes, a deteção do CI não é necessária porque um elevado número de cópias do alvo pode causar uma amplificação preferencial de ácidos nucleicos específicos do alvo.

2 Uma amostra é considerada negativa se não mostrar um sinal de amplificação no sistema de deteção, mas o controlo interno for positivo (Ct inferior a 35). A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controlo interno. Em caso de resultados não resolvidos (UNR), ausência do sinal de controlo interno nas amostras negativas, é recomendado repetir o ensaio seguindo as indicações abaixo.

Em caso de um resultado ambíguo contínuo, é recomendável reler as instruções de utilização, o processo de extração usado pelo utilizador; para verificar o desempenho correto de cada passo da PCR e rever os parâmetros e para verificar a forma sigmoideia da curva e a intensidade da fluorescência.

NOTA: Poderão ser testadas novas amostras na mesma sequência com amostras repetidas.

O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.

10. Limitações do teste

- O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.
- Embora este ensaio possa ser usado com outros tipos de amostras, foi validado com BAL. Adicionalmente, se forem usadas amostras de expetoração, estas podem ser testadas de acordo com as recomendações citadas acima.
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao selo de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.

- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; tem de ser extraído ácido nucleico de forma adequada a partir de amostras respiratórias.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos nem indica o número de organismos presentes.
- Podem ser detetados níveis extremamente baixos de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Subsiste a possibilidade de resultados falsos positivos devido a contaminação cruzada por amostras suspeitas de *Pneumocystis jirovecii* que contenham concentrações elevadas de ADN do alvo, ou contaminação decorrente dos produtos da PCR de reações anteriores.
- As combinações de oligonucleótidos e sondas específicos para a deteção do gene *mt LSU rRNA* usados no VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, não mostram homologies combinadas significativas com o genoma humano, a microflora humana ou outros microrganismos respiratórios, passíveis de resultar em falsos positivos previsíveis.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ADN).
 - Degradação do ADN durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
 - Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do oligonucleótido ou sonda podem afetar a deteção de estirpes de *Pneumocystis jirovecii* novas ou desconhecidas.
 - Níveis do organismo na amostra abaixo do limite de deteção ou do valor limite para o ensaio.
 - A presença de inibidores de qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes.
 - A não observância das instruções de utilização e do procedimento do ensaio.
- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de fungos viáveis, e não implica que estes fungos são infecciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. No entanto, um resultado positivo é indicativo da presença de sequências dos alvos de *Pneumocystis jirovecii*.
- Se os testes de diagnóstico de outras doenças respiratórias forem negativos e a apresentação clínica do doente e as informações epidemiológicas sugerirem a possibilidade de infeção por *Pneumocystis*, então deve considerar-se o resultado como um falso negativo e deve discutir-se a possibilidade de testar novamente o doente.
- Um resultado negativo não exclui a presença de ARN de *Pneumocystis jirovecii* DNA num espécime clínico. Se as observações clínicas, historial do doente e informações epidemiológicas sugerirem a presença de infeção por *Pneumocystis*, a repetição do teste, aumentando o volume da amostra, deve ser considerada.
- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos, com o VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, será necessário repetir o teste. Resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra, ou uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém um controlo interno (CI) em cada tubo de reação, que confirma a aplicação correta da técnica.

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado utilizando amostras clínicas (lavagens broncoalveolares) já caracterizadas como positivas ou negativas para *P. jirovecii*. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	Institute of Medical Microbiology and Virology, Technische Universität Dresden (Alemanha)	Lavagens broncoalveolares	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>P. jirovecii</i>

Tabela 16. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores positivos e negativos verdadeiros, os valores positivos e negativos falsos, a sensibilidade e a especificidade do VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foram calculados em relação a cada ensaio comparativo, conforme mostrado na tabela seguinte:

Centro	Ensaio comparativo	Alvo	PV	NV	PF	NF	Sensibilidade	Especificidade
1	Ensaio de PCR RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> *	<i>P. jirovecii</i>	38	128	0	5	88% (79 – 94)	100% (98 – 100)

Tabela 17. Valores positivos e negativos verdadeiros, valores positivos e negativos falsos, sensibilidade e especificidade do VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* O RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR assay é um ensaio qualitativo; amostras com concentrações ≥ 3000 cópias/ml foram consideradas positivas

Dada a importância de se estabelecer um diagnóstico correto, foi considerado um valor de corte, de modo a obter uma estimativa da carga fúngica e, conseqüentemente, distinguir entre doente infetado e doente colonizado. Este valor de corte baseou-se nos valores de referência obtidos a partir da literatura (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), bem como nos valores de sensibilidade e especificidade obtidos neste estudo clínico. Uma carga fúngica superior a 3×10^4 cópias/ml ($C_t < 30$) é bastante sugestiva de pneumonia por *P. jirovecii*, ao passo que uma carga fúngica inferior a 3×10^3 cópias/ml ($C_t > 33$) corresponde, habitualmente, a colonização.

O método de ensaio comparativo utilizado na avaliação clínica foi o RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR (Altona). Este método permite a quantificação da carga fúngica, pois são incluídos em cada ensaio padrões de quantificação de *Pneumocystis jirovecii*. Das 43 amostras que apresentaram um valor de quantificação $> 3 \times 10^3$ cópias/ml utilizando o ensaio comparativo, 38 revelaram um valor de $C_t < 33$ utilizando o VIASURE *Pneumocystis*

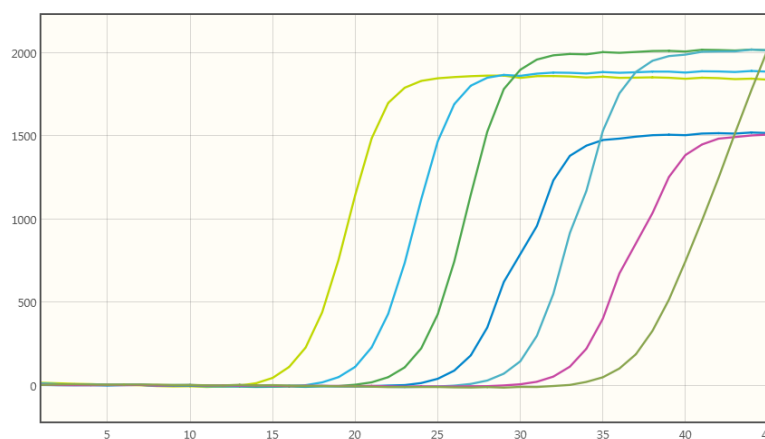
jirovecii Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Por outro lado, todas as amostras que apresentaram um valor de quantificação $< 3 \times 10^3$ cópias/ml revelaram um valor de Ct > 33 ou eram negativas.

Os resultados mostram concordância para detetar *Pneumocystis jirovecii* utilizando o VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilidade analítica

O VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de detecção (LdD) de 236 cópias por reação em lavagens broncoalveolares (BAL), com uma taxa positiva $\geq 95\%$:

Figura 2. Ensaio de séries de diluições de modelo de *Pneumocystis jirovecii* ($2,36 \times 10^7$ - $2,36 \times 10^1$ cópias por reação) no BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).



12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio *Pneumocystis jirovecii* foi confirmada testando um painel composto por diferentes microrganismos representando os agentes patogénicos respiratórios mais comuns. Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre qualquer um dos seguintes microrganismos testados:

Teste de reatividade cruzada					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	HHV6, estirpe Z29	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Adenovírus humanos tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	VHH-6, Tipo A	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	VHH-6, Tipo B	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	VHS-1, estirpe MacIntyre	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Vírus BK Tipo Ib-2	-	VHS-2 MS	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a/estirpe CCUG 15531	-
Vírus BK Tipo IV	-	Vírus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Listeria ivannovii</i> serotipo 5/estirpe CCUG 15528	-
Bocavirus	-	Vírus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotipo 1/2b	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotipo 4b/estirpe CIP 59.53	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-	-	Metapneumovírus A e B humano	-

Teste de reatividade cruzada					
		180 (H1N1)pdm09			
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Parvovírus B19	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genótipo A e C	-	Vírus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Vírus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Citomegalovírus estirpe AD-169	-	Vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Vírus Sincicial Respiratório (RSV)	-
Coronavírus humano 229E, OC43 e NL63	-	Vírus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Rinovírus humano	-
Coronavírus MERS	-	Vírus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> , subespécie <i>aureus</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	Vírus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	Vírus JC Tipo 1A	-	<i>Toxoplasma gondii</i> Tipo II	-
Vírus Epstein-Barr	-	Vírus JC Tipo 2B	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Escherichia coli</i> O.1285;O18:H7:K1	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Vírus Varicella-Zoster Ellen	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Hepatite A	-				

Tabela 18. Microrganismos patogênicos de referência utilizados neste estudo.











12.4. Reatividade analítica

A reatividade do VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi avaliada em comparação com ADN extraído de *P. jirovecii* Tipo 1A, *P. jirovecii* g885652 e *P. jirovecii* j888023, apresentando resultados positivos.

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/ Símbolos para componentes IVD e reagentes

	<i>In vitro</i> diagnostic device Produto para diagnóstico <i>In vitro</i>		Keep dry Armazenar em local seco		Use by Data de validade		Manufacturer Fabricante		Batch code (Lot) Código do lote
	Consult instructions for use Consultar as instruções de utilização		Temperature limitation Limitação de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contém <n> teste(s)		Unique Device Identification Identificação única de dispositivo		Catalog number Número de referência

Trademarks

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

Change Control / Controlo de alterações		
Version No. / Versão n.º.	Changes / Alterações	Date / Data
00	Original version / Versão original.	02/11/2022

Table A 2. Control change table/ Tabela de controlo de alterações.

Revision: 2nd November 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