

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Pneumocystis jirovecii

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-JIR106L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-JIR106H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-JIR112L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-JIR112H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-JIR113L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-JIR113H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR136
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR172



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit is designed for qualitative and quantitative detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe 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 is designed for the diagnosis of *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 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 could be measured on real time PCR platforms. In addition, quantification of specific *Pneumocystis jirovecii* DNA can be achieved by generating of a standard curve using the *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard provided with the kit.



VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contains in each well 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 discard the inhibition of the polymerase activity. *Pneumocystis jirovecii* DNA targets are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1, 2 and 3. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices (See Annex 1). Table 3 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR106L, VS-JIR106H, VS-JIR112L and VS-JIR112H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-JIR113L and VS-JIR113H.



Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	9/18 X 4-cap strip

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR136 and VS-JIR172. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid) and Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

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.



- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7 Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- 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 once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-JIR113L, VS-JIR113H, VS-JIR136 and VS-JIR172). 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 envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-JIR136 and VS-JIR172 (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross 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 or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, 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, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Do not confuse *Pneumocystis jirovecii* Positive Control vial with *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard vial.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.



8. Test procedure

8.1. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For DNA extraction from respiratory samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- EZ1 Virus Mini Kit, using EZ1 instrument (Qiagen).

8.2. Lyophilized positive control and quantitative standard

Pneumocystis jirovecii Positive Control and *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard contain high copies template, the recommendation is to open and manipulate them in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control and/or *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (red vials) adding 100 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. Standard curve preparation for quantitative assay

This kit can be used to quantify the DNA copy number of *Pneumocystis jirovecii*. To perform a quantitative assay, a standard curve must be prepared by serial dilution of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (which contains approximately 2×10^7 copies/µl*). Take *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (white pouch, red vial) as the starting high standard in the first tube, and prepare the standard curve dilution series as follows:

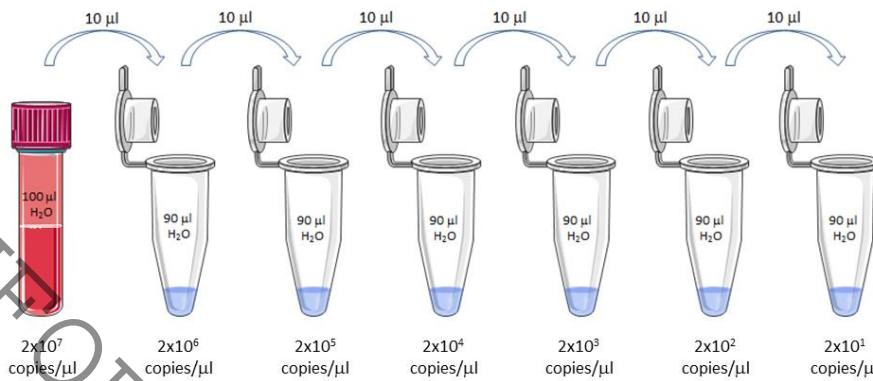
- Pipette 90 µl of RNase/DNase free Water in 6 microcentrifuge tubes (1.5 mL or 2 mL).
- Add 10 µl of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard to the first tube to get a standard with about 2×10^6 copies/µl. Mix by vortex and centrifuge briefly.
- Add 10 µl of standard with $\sim 2 \times 10^6$ copies/µl to the second tube to get a standard with approximately 2×10^5 copies/µl. Mix by vortex and centrifuge briefly.
- Repeat the previous step sequentially to complete the dilution series for standards with about 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 and 2×10^1 copies/µl (See Figure 1).

* For more details see "Certificate of Analysis", where lot number and DNA copy number of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard are detailed.



Dilution is not needed for performance of qualitative real-time PCR assay. In those assays, recommendation is to use *Pneumocystis jirovecii* Positive Control to minimize the risk of cross-contamination.

Figure 1. Preparation of the standard curve dilution series for quantitative assay



8.4. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, Negative Control (violet vial), *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (aluminum pouch, red vial) for qualitative test or standard curve dilutions for quantitative assays in different wells, and close the wells with the caps provided.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kits).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 4. PCR protocol



Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Pneumocystis jirovecii*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

9.1. Qualitative assay

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Pneumocystis jirovecii* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

Using the following table read and analyze the results:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive
-	+	-	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Negative
-	-	-	-	Experiment fail
+	+	+	+	Experiment fail

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification curve

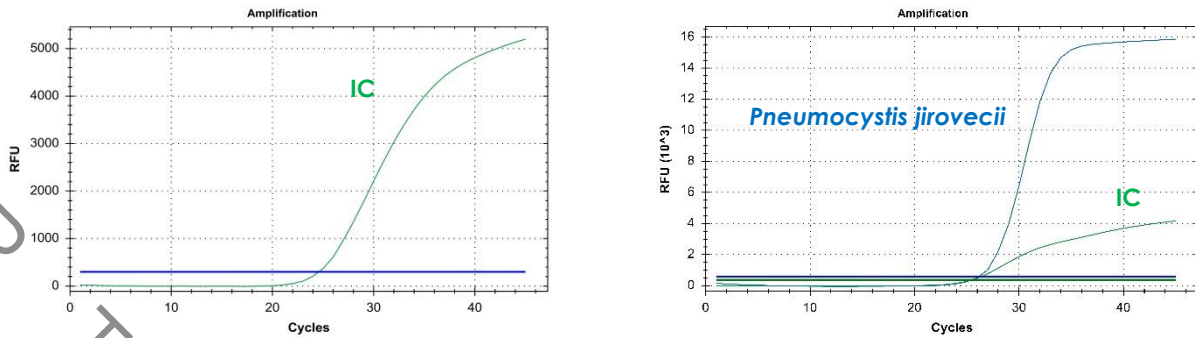
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.



Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



Negative control

Positive control

The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. 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.

9.2. Quantitative assay

A standard curve can be generated from the dilution series of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard following the formula:

$$Ct = m \log (Q) + b$$

Where: Ct = Threshold Cycle

m = Slope

Q = Concentration

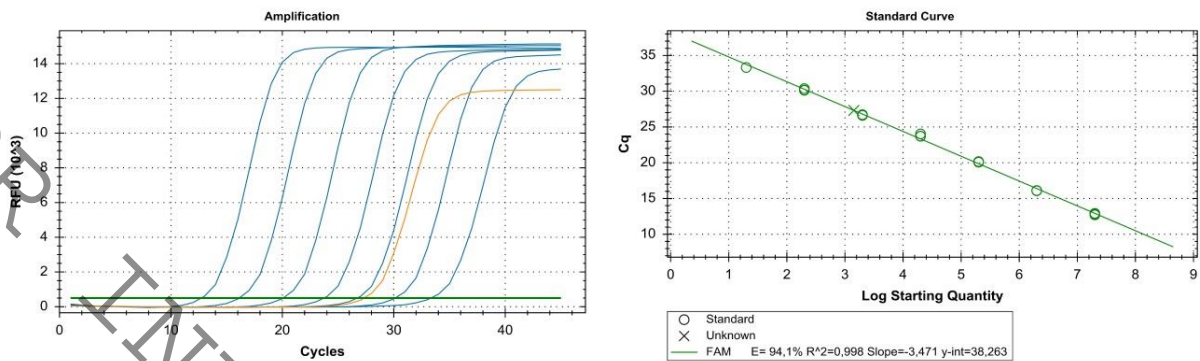
b = Intercept

Positive samples of unknown concentration can be quantified by interpolating their Ct value in the standard curve according to the formula:

$$Q = 10^{(Ct-b)/m}$$



Figure 3. Standard curve from the dilution series (blue) and quantification of a positive sample of unknown concentration (orange) run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



The concentration of your "Positive sample" is displayed in copies/ μ l and refers to the concentration in the Eluted DNA not to the original clinical sample. To determine the target concentration of the original sample, take into account the dilutions of the extraction procedure and PCR Set-up

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 only with DNA extracted from bronchoalveolar lavage (BAL) specimens.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- 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*, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well 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 was tested using 14 bronchoalveolar lavage from patients with suspicious of pneumocystis pneumonia. These results were compared with those obtained by other real-time PCR commercial kit (FTD *Pneumocystis jirovecii*, Fast-Track DIAGNOSTICS).

The results were as follows:

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Fast-Track DIAGNOSTICS)		
		+	-
+	11	0	11
-	0	3	3
Total	11	3	14

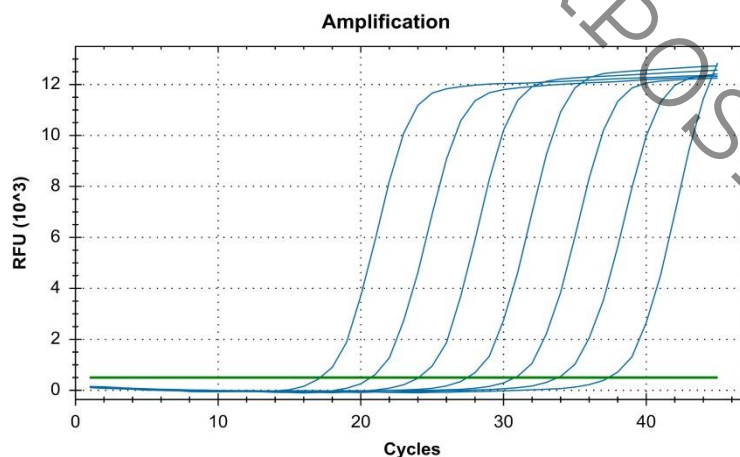
Table 6. Comparative results.

The results show a high sensitivity and specificity to detect *Pneumocystis jirovecii* using VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction (Figure 4).

Figure 4. Dilution series of *Pneumocystis jirovecii* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



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>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
<i>Fluoribacter bozemanæ</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human Adenovirus	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Legionella longbeachæ</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 virus	-	Human rhinovirus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus	-		

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Pneumocystis jirovecii* Type 1A, *Pneumocystis jirovecii* g885652 and *Pneumocystis jirovecii* j888023, showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".
 (2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
 (3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.
 (4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
 (5) No detection in Cy5 channel.
 (6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa y cuantitativa de *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Pneumocystis jirovecii* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Pneumocystis jirovecii*.

2. Introducción y explicación

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP) se trata una enfermedad pulmonar aguda y potencialmente mortal causada por el hongo *Pneumocystis jirovecii*. PCP es una enfermedad importante en pacientes inmunocomprometidos, principalmente con VIH, así como pacientes con un sistema inmunológico comprometido por otras razones. En pacientes con un sistema inmunológico normal, se trata de una infección silenciosa muy común. En regiones en vías de desarrollo, se suponía que la prevalencia de la PCP era mucho más baja, sin embargo varios estudios han demostrado que esta incidencia se debe más a un fallo en el diagnóstico.

Los síntomas de PCP son muy inespecíficos, además en pacientes con VIH a menudo tienden a aparecer más tarde, normalmente después de varias semanas comparado con pacientes con otro tipo de inmunosupresión. Los síntomas de PCP incluyen los siguientes: disnea de esfuerzo progresiva, fiebre, tos no productiva, malestar en el pecho, pérdida de peso, escalofríos y hemoptisis (inusual).

PCP es difícil de diagnosticar debido a que está asociado a signos y síntomas no específicos. *P.jirovecii* no puede aislarse mediante cultivo, la visualización microscópica de quistes o formas trópicas en muestras pulmonares con tinción citoquímica o inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales y/o amplificación de DNA, son los procedimientos estándar para la detección de este microorganismo.

3. Procedimiento

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Pneumocystis jirovecii* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen codificante de la subunidad grande del rRNA mitocondrial.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de



PCR a tiempo real. Además, la cuantificación de DNA específico de *Pneumocystis jirovecii* puede realizarse creando una curva estándar a partir del *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard incluido en el kit.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación de las secuencias diana de DNA de *Pneumocystis jirovecii* y del control interno, *Pneumocystis jirovecii* se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Estándar para cuantificación	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-JIR106L, VS-JIR106H, VS-JIR112L y VS-JIR112H.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Estándar para cuantificación	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-JIR113L y VS-JIR113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Estándar para cuantificación	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-JIR136 y VS-JIR172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador)
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL. y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).



VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenamiento de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-JIR113L, VS-JIR113H, VS-JIR136 y VS-JIR172). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-JIR136 y VS-JIR172 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.



- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo..
- No confundir el vial de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control con el vial de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de muestras respiratorias puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- EZ1 Virus Mini Kit, utilizando EZ1 instrument (Qiagen).

8.2. Control positivo liofilizado

Pneumocystis jirovecii Positive Control y *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard contienen una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlos y manipularlos en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Pneumocystis jirovecii* Positive Quantitative Control y/o *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard liofilizados (viales rojos) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.



8.3. Preparación de una curva estándar para ensayos cuantitativos

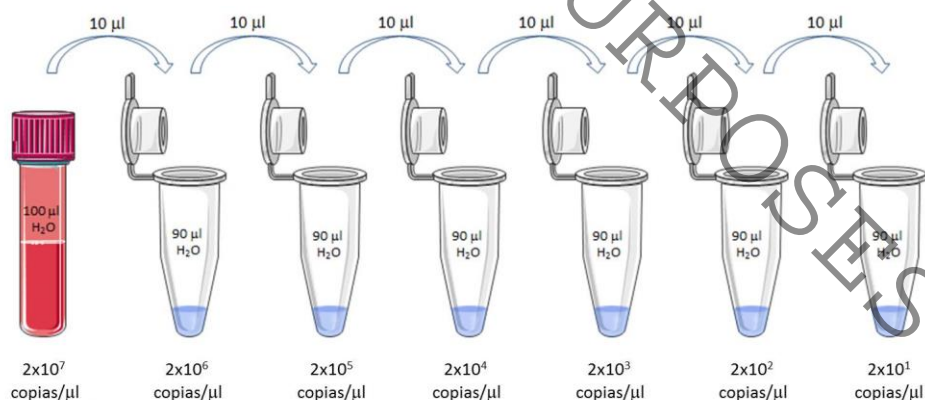
Este kit puede utilizarse para cuantificar el número de copias de DNA de *Pneumocystis jirovecii*. Para realizar ensayos cuantitativos, se recomienda preparar una curva estándar mediante diluciones seriadas a partir de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (el cual contiene aproximadamente 2×10^7 copias/ μl *). Partiendo de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (sobre blanco, vial rojo) como el estándar de mayor concentración, preparar el resto de diluciones seriadas como se indica a continuación:

- Pipetear 90 μl de RNase/DNase free Water en 6 tubos de microcentrífugas (1.5 mL o 2 mL).
- Añadir 10 μl de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard al primer tubo para obtener un estándar con aproximadamente 2×10^6 copias/ μl . Mezclar con la ayuda de un vórtex y centrifugar brevemente.
- Añadir 10 μl del estándar con 2×10^6 copias/ μl al segundo tubo para conseguir un estándar con aproximadamente 2×10^5 copias/ μl . Mezclar con la ayuda de un vórtex y centrifugar brevemente.
- Repetir el paso anterior de forma secuencial para completar las diluciones seriadas con estándares con aproximadamente 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 y 2×10^1 copias/ μl (ver figura 1).

* Para más detalles consulte el "Certificado de análisis" el número de lote y el número de copias de DNA de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard.

La preparación de diluciones no es necesaria para realizar ensayos cualitativos. En ese tipo de ensayos, se recomienda utilizar *Pneumocystis jirovecii* Positive Control para minimizar el riesgo de contaminación cruzada.

Figura 1. Preparación de las diluciones de la curva estándar para ensayos cuantitativos



8.4. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, Negative Control (vial morado), *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (sobre de aluminio, vial rojo) para ensayos cualitativos o diluciones para la curva estándar (ensayos cuantitativos) en diferentes pocillos, y cerrar los pocillos con los tapones suministrados

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Pneumocystis jirovecii*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

9.1. Ensayo cualitativo

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Pneumocystis jirovecii*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:



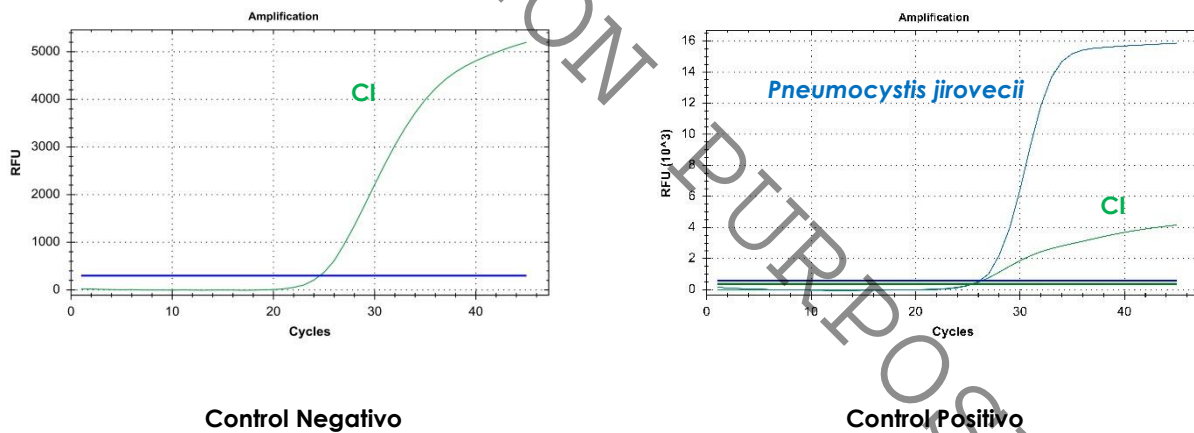
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM)	Control interno (HEX)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positivo
-	+	-	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Negativo
-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	Inválido

Tabla 5. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.



9.2. Ensayo cuantitativo

Se puede crear una curva estándar a partir de las diluciones seriadas de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard según la fórmula:

$$Ct = m \log (Q) + b \quad \text{Donde: } Ct = \text{ciclo umbral}$$

m = pendiente

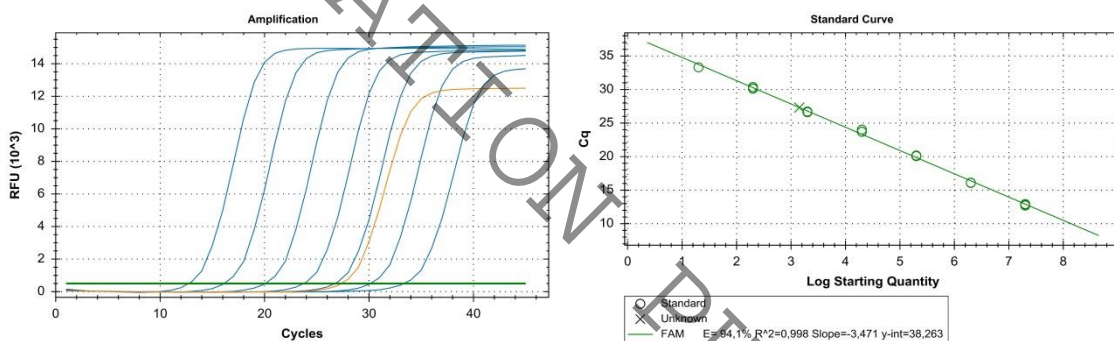
Q = concentración

b = intersección

Las muestras positivas de concentración desconocida pueden cuantificarse interpolando su valor de Ct en la curva estándar siguiendo la fórmula:

$$Q = 10^{(Ct-b)/m}$$

Figura 3. Curva estándar a partir de las diluciones seriadas (azul) y cuantificación de una muestra positiva de concentración desconocida (naranja) generada en un Bio-Rad CFX96TM Real-Time PCR Detection System.



La concentración de su "Muestra positiva" se indica en copias/ μ l, y hace referencia a la concentración del DNA eluído, no de la muestra clínica original. Para determinar la concentración de la muestra original, tenga en cuenta las diluciones correspondientes a la extracción y a la preparación de la PCR.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DAN extraído de muestras de lavados broncoalveolares.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.

- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Pneumocystis jirovecii*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 14 muestras respiratorias procedentes de lavados broncoalveolares de pacientes con sospecha de neumonía por *Pneumocystis* utilizando VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos con otro kit comercial de PCR a tiempo real (FTD *Pneumocystis jirovecii*, fast-track DIAGNOSTICS).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Fast-Track DIAGNOSTICS)			
		+	-	Total
+		11	0	11
-		0	3	3
Total		11	3	14

Tabla 6. Comparativa de resultados.

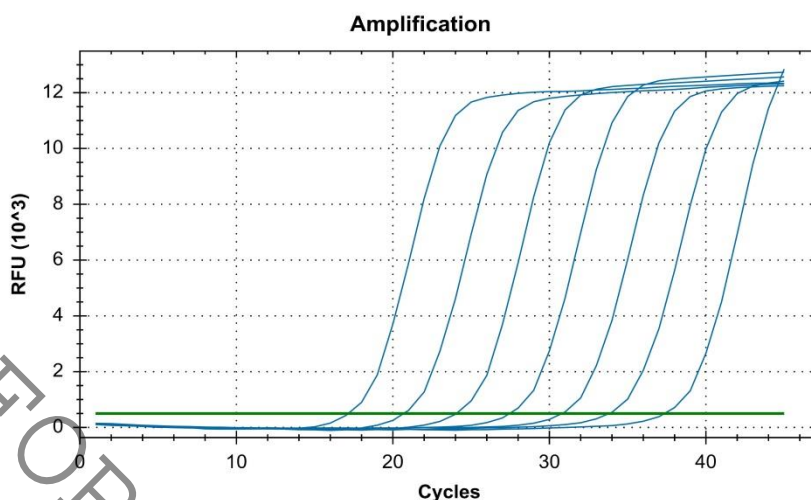
Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Pneumocystis jirovecii* utilizando VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción (Figura 4).



Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar *Pneumocystis jirovecii* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Pneumocystis jirovecii* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-
<i>Fluoribacter bozemanii</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Adenovirus humano	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Metapneumovirus A y B humano	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Rinovirus humano	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-		

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.











12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *Pneumocystis jirovecii* Type 1A, *Pneumocystis jirovecii* g885652 y *Pneumocystis jirovecii* j888023, mostrando unos resultados positivos.

13. Bibliography/Bibliografía

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.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Sample diluent Diluyente de muestra		Catalogue number Número de referencia



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	583/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: May 2019

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC