

Vitassay qPCR

Pneumocystis jirovecii

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y cuantitativa de *Pneumocystis jirovecii* en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative and quantitative detection of *Pneumocystis jirovecii* in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* permite la detección cualitativa y cuantitativa de *Pneumocystis jirovecii* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de las infecciones respiratorias producidas por *P. jirovecii*.

Referencias

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* 4 x 8-well strip, low profile 7041026

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* 4 x 8-well strip, high profile 7042026

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S026/ 7042S026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> strips bajo/alto perfil	-	4 tiras de 8 pocillos
7C026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	rojo	1 vial
7Q026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative standard	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex

- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

La neumonía por *Pneumocystis* (PCP) es una enfermedad grave causada por el hongo *Pneumocystis jirovecii*. PCP es una de las infecciones oportunistas más frecuentes y graves en las personas con sistemas inmunes debilitados, en particular las personas con VIH/SIDA. Aunque las personas con VIH/SIDA son menos propensas a desarrollar PCP en los últimos años, el PCP sigue siendo un problema importante de salud pública.

Los siguientes grupos están en riesgo de sufrir neumonía por *P. jirovecii*: personas con infección por VIH con un bajo recuento de CD4, con deficiencias inmunes primarias, que reciben regímenes inmunosupresores a largo plazo, enfermedades malignas hematológicas y con desnutrición severa.

La presentación clínica en pacientes VIH-positivos es bien conocida y consiste en disnea, fiebre y tos, mientras que la presentación de PCP en pacientes VIH-negativos es atípica y se compone de un brote repentino, desaturación de O₂, y un rápido resultado letal sin terapia.

El diagnóstico de laboratorio de la neumonía por *Pneumocystis*, todavía se basa en la observación microscópica mediante tinción y/o inmunofluorescencia de muestras de lavado broncoalveolar (BAL). Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos permiten superar las dificultades del diagnóstico mediante de examen microscópico. En concreto, la PCR en tiempo real (qPCR) reduce el riesgo de resultados falsos positivos debido a contaminaciones, aumenta la sensibilidad y especificidad, y los datos resultantes son semi-cuantitativos.

Principio del test

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región diana conservada del gen codificante de la subunidad grande del rRNA mitocondrial. Tras la extracción de DNA, la presencia de *P. jirovecii* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* se trata de un test listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato liofilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal

FAM mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Puede realizarse la cuantificación de DNA de *P. jirovecii* creando una curva estándar a partir de Pneumocystis jirovecii Quantitative Standard incluido en el kit.

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

EZ1 Mini Kit, EZ1 instrument (Qiagen)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

Preparación del control positivo y estándar cuantitativo

Reconstituir el contenido liofilizado del *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y/o el Quantitative Standard (tubos rojos) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex.

Después del primer uso del *Pneumocystis jirovecii* Positive Control, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

Ambos controles contienen una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la curva estándar

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 (tubo rojo, el cual contiene aproximadamente 2×10^7 copias/µl*). El contenido de este vial será el estándar con mayor concentración, a partir de éste, se prepararán el resto de las diluciones seriadas tal y como se indica a continuación:

- Pipetear 90 µL de PCR grade water en 6 tubos de microcentrífuga
- 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 proximadamente 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.

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

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*Pneumocystis jirovecii*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). 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 esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en el canal FAM.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Análisis cualitativo

Con la ayuda de la siguiente tabla, 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

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Análisis cuantitativo

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

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

Donde: C_t = 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:

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

La concentración de las muestras se obtiene 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.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Se analizaron 14 muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con sospecha de neumonía por *Pneumocystis*. Se obtuvo un resultado positivo en 11 y negativo en 3 de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* fueron comparados con otro kit comercial de PCR a tiempo real (FTD *Pneumocystis jirovecii*, fast-track DIAGNOSTICS). La concordancia entre ambos test fue del 100%.

Además, Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* fue evaluada con el programa EQA: QCMD 2017 *Pneumocystis jirovecii* pneumonia DNA (PCPDNA17). Este programa consistía en 10 muestras que contenían diferentes concentraciones del patógeno de estudio o eran negativas a éste. Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* detectó correctamente todas las muestras del panel de estudio.

Estos resultados muestran la elevada sensibilidad y especificidad para detectar *Pneumocystis jirovecii* utilizando el kit de diagnóstico molecular Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii*.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de *Pneumocystis jirovecii* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Pneumocystis jirovecii* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus
<i>Fluoribacter bozemanæ</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
<i>Legionella micdadei</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 virus
<i>Legionella dumoffii</i>	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus
<i>Legionella longbeachæ</i>	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza B/Florida/04/06 virus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Human Adenovirus 5
<i>Haemophilus influenzae</i>	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Human coronavirus 229E
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Respiratory syncytial virus (RSV)	Human metapneumovirus A and B
Human rhinovirus	

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Pneumocystis jirovecii* Type 1A, *Pneumocystis jirovecii* g885652 y *Pneumocystis jirovecii* j888023, como molde.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por *Pneumocystis jirovecii*. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado con muestras de lavados broncoalveolares. El uso de otro tipo de muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas respiratorias. 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 del DNA 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.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	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	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	Al configurar los canales, 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000



Intended use

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* allows the qualitative and quantitative detection of *Pneumocystis jirovecii* by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* 4 x 8-well strip, low profile 7041026

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* 4 x 8-well strip, high profile 7042026

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S026/ 7042S026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	red	1 vial
7Q026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative standard	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips

- Powder-free disposal gloves

Summary

Pneumocystis pneumonia (PCP) is a serious illness caused by the fungus *Pneumocystis jirovecii*. PCP is one of the most frequent and severe opportunistic infections in people with weakened immune systems, particularly people with HIV/AIDS. Although people with HIV/AIDS are less likely to get PCP today than in recent years, PCP is still a significant public health problem.

The following groups are at risk for *P. jirovecii* pneumonia: persons with HIV infection with low CD4 count, persons with primary immune deficiencies, persons receiving long-term immunosuppressive regimens, persons with hematologic and nonhematologic malignancies, persons with severe malnutrition.

The presentation of PCP in HIV-positive patients is well-known and consists of a triad of dyspnea, fever, and cough, whereas the presentation of PCP in HIV-negative patients is atypical and consists of a sudden outbreak, O₂ desaturation, and a rapid lethal outcome without therapy.

The laboratory diagnosis of Pneumocystis pneumonia (PCP), still relies on tinctorial and/or immunofluorescent staining of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples. Nucleic acid amplification tests can overcome the difficulties of microscopic examination. Real-time quantitative PCR (qPCR) reduces the risk of false-positive results because of the closed-tube nature of the amplification process, and the resulting data are semi-quantitatives.

Principle of the test

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *mt large-subunit* rRNA gene of *Pneumocystis jirovecii* genome. After DNA extraction, *P. jirovecii* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* is a ready-to used test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the target sequence is detected through the FAM channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used). In addition, quantification of *P. jirovecii* DNA can be achieved by generating a standard curve using *P. jirovecii* quantitative standard provide with the kit.

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

EZ1 Mini Kit, EZ1 instrument (Qiagen)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)

Positive control and Quantitative Standard preparation

Reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control and the Quantitative Standard (red tubes) with 100 µl of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly.

For *Pneumocystis jirovecii* Positive Control, after first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Standard Curve Preparation

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 *). Prepare the standard curve dilution series as follows:

- Pipette 90 μl of PCR grade water into 6 microcentrifuge tubes.
- Add 10 μl of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard to the first tube to get a standard with about 2×10^6 copies/ml. 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 .

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

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 μl of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 μl of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*Pneumocystis jirovecii*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (*Pneumocystis jirovecii*), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal for FAM (*Pneumocystis jirovecii*), which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

Qualitative analysis

The result interpretation is summarized in the following table:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> FAM	Internal Control HEX	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive
-	+	-	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Negative
+	+	+	+	Invalid
-	-	-	-	Invalid

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quantitative analysis

Using standard curve dilution series results a standard curve for quantitative analysis can be generated:

$$Ct = m \log(Q) + b \quad \text{Where: } Ct = \text{Threshold Cycle}$$

$$m = \text{Slope}$$

$$Q = \text{Concentration}$$

$$b = \text{Intercept}$$

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

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

The concentration of the samples is displayed in copies/μl 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.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* was evaluated using 14 bronchoalveolar lavage from patients with suspicious of *Pneumocystis* pneumonia. We obtained a positive result for 11 samples and a negative result for 3 of them with Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii*. The results were compared with other real-time PCR commercial kit (FTD *Pneumocystis jirovecii*, fast-track DIAGNOSTICS). The concordance between both tests was 100%.

In addition, Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* was evaluated with the EQA programme: QCMD 2017 *Pneumocystis jirovecii* pneumonia DNA (PCPDNA17). This programme consisted on 10 samples with different concentrations of the studied pathogen or were negative to it. Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* detected correctly all samples from the studied panel.

These results show the high sensitivity and specificity to detect *Pneumocystis jirovecii* using the molecular diagnostic kit Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii*.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *Pneumocystis jirovecii* template ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for *Pneumocystis jirovecii* was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus
<i>Fluoribacter bozemanæ</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
<i>Legionella micdadei</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 virus
<i>Legionella dumoffii</i>	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus
<i>Legionella longbeachæ</i>	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza B/Florida/04/06 virus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Human Adenovirus 5
<i>Haemophilus influenzae</i>	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Human coronavirus 229E
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Respiratory syncytial virus (RSV)	Human metapneumovirus A and B
Human rhinovirus	

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* was confirmed by the real-time amplification using *Pneumocystis jirovecii* Type 1A, *Pneumocystis jirovecii* g885652 and *Pneumocystis jirovecii* j888023 as template.

Compatible real-time PCR equipment

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with bronchoalveolar lavage (BAL) specimens. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from respiratory clinical specimens 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 may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Pneumocystis jirovecii*, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation 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 ROX is 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with and without human immunodeficiency virus infection. Su YS, Lu JJ, Perng CL, Chang FY. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008 Dec. 41(6):478-82.
2. *Pneumocystis* pneumonia in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features. Fujii T, Nakamura T, Iwamoto A. *J Infect Chemother.* 2007 Feb. 13(1):1-7.
3. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. *Infection.* 2009 Jun;37(3):261-5.
4. Cryptococcal vs *Pneumocystis (carinii) jiroveci* pneumonia (PCP): Clinical & Microbiology differential diagnostic considerations. Cunha BA, Schoch PE, Barbari N. *Infect Dis Pract.* 2006. 30:514-517.

Trademarks

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™ and Mx3005™ 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

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number

