

VA Vitassay

Real-Time PCR Kits

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 <i>Pneumocystis jirovecii</i> , 4x8-well strip, low profile	7041026
Vitassay qPCR <i>Pneumocystis jirovecii</i> , 4x8-well strip, high profile	7042026

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041026 y 7042026:

Código	Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Color	Cantidad
7041S026/ 7042S026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> strips bajo/alto perfil	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL *	-	4 tiras de 8 pocillos
		dNTPs	±1 mM *		
		Cebadores y sondas	0,2-1 nMol/μL *		
		Enzimas	10-100 U/rxn *		
7C026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL *	rojo	1 vial
7Q026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL *	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Solución salina	±13 mM	verde	1 vial x 1,8 mL
		Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
7003N	Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	Tapas ópticas para sellar las tiras en el ciclo térmico	-	-	4 tiras de 8 tapones

* En el caso del componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Material y equipamiento necesario, no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (-30°C a -10°C y/o ≤ -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20μL, 20-200 μL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo
- Blanco de muestra (Ver Extracción DNA).

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits (antes del uso) puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez en uso ver las condiciones de almacenamiento de cada componente. Evitar agitaciones durante el transporte para prevenir la fuga de líquidos.

- El control positivo y el estándar cuantitativo resuspendidos deben ser almacenados a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. La estabilidad del control positivo y del Quantitative Standard se ha validado tras 6 ciclos de congelación y descongelación. Sin embargo, se recomienda distribuir en alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.
- Para el estándar cuantitativo, los ciclos de congelación y descongelación solo son aplicables para el vial reconstituido y sus alícuotas. Para el uso correcto del producto, las diluciones de la curva estándar deben desecharse después de cada uso.
- Para el uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar los pocillos que no se necesiten. Los pocillos no utilizados pueden cortarse fácilmente antes de retirar el aluminio protector y almacenarse en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro y cerradas con el cierre zip para evitar el contacto con la luz o la humedad y guardarse a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez que los pocillos han sido rehidratados debe realizarse de forma inmediata la adición del ácido nucleico y la qPCR.
- Una vez abiertos los componentes Resuspension buffer, PCR grade water y Negative Control deben ser almacenados a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Resumen

Pneumocystis jirovecii (PJ) es un hongo patógeno oportunista que puede causar neumonía grave en huéspedes inmunodeprimidos. Entre los factores de riesgo de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PJP) se encuentran el VIH, los trasplantes de órganos, las neoplasias, ciertas enfermedades inflamatorias o reumatológicas y las terapias asociadas y condiciones que provocan una inmunodeficiencia celular (Weyant et al. 2021).

Los signos y síntomas de esta PJP son inespecíficos e incluyen disnea progresiva, fiebre baja, tos no productiva, hipoxemia, así como estertores secos difusos en la exploración (Weyant et al. 2021).

La forma quística de *Pneumocystis* se propaga por el aire de persona a persona. En el huésped los quistes se reciben en los pulmones, y en la mayoría de los casos su presencia es asintomática. Los casos de PJP pueden deberse a la reactivación de una infección latente o a la transmisión de-novo de persona a persona (especialmente en brotes). Esta alta tasa de colonización y transmisión asintomática permite que los inmunocompetentes actúen como reservorios desconocidos del patógeno (Weyant et al. 2021).

La prevalencia de la PJP ha disminuido significativamente en las personas que viven con el VIH gracias a la terapia antirretroviral combinada (cART) y a la práctica habitual de prescribir profilaxis. Incluso con tratamiento, la mortalidad de la PJP es elevada, y es mayor en los pacientes sin VIH (20-50%) que en las personas seropositivas (10-30%) (Weyant et al. 2021). Los pacientes sin VIH pueden presentar una enfermedad que progresa con rapidez, probablemente debido a una respuesta inmunitaria más intensa a la PJP en los pulmones que en los pacientes con VIH (Ibrahim et al. 2023). Aunque la mayoría de los pacientes mejoran con un tratamiento adecuado, algunos desarrollan una insuficiencia respiratoria progresiva. La mortalidad entre los pacientes que precisan ingreso en cuidados intensivos o ventilación mecánica alcanza el 60% (Truong et al. 2023).

El diagnóstico diferencial de la PJP incluye el síndrome de dificultad respiratoria aguda, la tuberculosis, el citomegalovirus (CMV), la neumonía por *Legionella*, la neumonía por micoplasma, otras neumonías víricas o bacterianas, la embolia pulmonar, la neumonía intersticial linfocítica y la infección por coronavirus 2019 (Ibrahim et al. 2023). Dado que los signos clínicos de la PJP son inespecíficos, el diagnóstico definitivo requiere la detección directa del microorganismo en las secreciones respiratorias bajas o en los tejidos (Weyant et al. 2021).

La evaluación de la PJP suele incluir una combinación de pruebas de imagen pulmonar, pruebas bioquímicas y muestras respiratorias adecuadas para su análisis (Weyant et al. 2021). Las pruebas de diagnóstico tradicionales se han basado en la tinción y visualización directa de las formas de vida en el líquido de lavado broncoalveolar. Este método ha demostrado ser poco sensible y pueden ser necesarios procedimientos invasivos para obtener muestras adecuadas. En un esfuerzo por resolver estos problemas, se han desarrollado métodos moleculares de detección como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y los ensayos anticuerpo-antígeno. Estas técnicas son muy sensibles y pueden detectar formas de vida de *Pneumocystis* en muestras no invasivas como esputo, lavados orales, aspirados nasofaríngeos y suero (Bateman et al. 2020).

Principio de la prueba

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del ARN ribosomal de la subunidad grande mitocondrial (*mtLSU* rRNA) de *P. jirovecii*. 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.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrolisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real. Además, puede realizarse la cuantificación de DNA de *P. jirovecii* creando una curva estándar a partir del estándar cuantitativo *Pneumocystis jirovecii* incluido en el kit.

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* se trata de una prueba lista 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 y verifica si la reacción de amplificación funciona correctamente. Los canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Diana	Canal detección
Gen <i>mtLSU rRNA (P. jirovecii)</i>	FAM
Control interno (CI)	HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado)

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el kit sin haber leído y entendido la información sobre procedimientos, precauciones y limitaciones proporcionada en las instrucciones de uso.
- 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 o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Utilizar las tiras inmediatamente después de haber retirado el aluminio protector para proteger la mezcla de reacción de la luz solar. No se recomienda dejar las tiras abiertas sin resuspender. Una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe llevar a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- Se recomienda cortar los pocillos requeridos/necesarios antes de retirar el sello protector de toda la tira. Guardar el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso (no retirar las bolsas de desecante del sobre). Elimine el exceso de aire de las bolsas antes de sellar.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Rehidratar los viales inmediatamente después de abrir el sobre del Control positivo y del Quantitative Standard y utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos adecuadamente. Dejar el vial abierto sin resuspender puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- 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. Una vez finalizada la prueba lávese bien las manos.
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- 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 y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Para cada muestra debe usarse una punta nueva. Es necesario cambiar de guantes antes de manipular los reactivos.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.

- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- El producto Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* solamente se ha validado con los equipos mencionados en el Apartado Termocicladores compatibles de estas Instrucciones de uso.
- Debe asegurarse de que la configuración de las condiciones en el termociclador se realiza siguiendo las instrucciones de la sección "Programación del termociclador"
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud de las mismas.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* ha sido testado en muestras respiratorias (fluido de lavados broncoalveolares, aspirados broncoalveolares, y esputos). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medio de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente como máximo durante 2 horas, o a 4°C durante máximo 7 días. Para un transporte de mayor duración (más de 7 días), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse a 4°C durante máximo 7 días o congeladas a -20°C o menos (-80°C idealmente) para su conservación durante más tiempo. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Extracción de DNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos de las muestras clínicas 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 Virus Mini Kit, utilizando el EZ1 instrument (Qiagen)
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega), utilizando el Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

Para el uso de kits de extracción de DNA distintos de los mencionados, la validación de éstos debe ser realizada por el usuario final, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

Debe tener en cuenta que el control positivo y negativo no deben ser extraídos. Para monitorizar y controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) que debería consistir en la misma matriz que las muestras clínicas (matriz real o simulada), y previamente haber sido caracterizado como negativo para todas las dianas.

Preparación del control positivo y estándar cuantitativo

Reconstituir el contenido liofilizado del *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (tubo rojo) con 400 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco) y el contenido liofilizado del *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex.

Una vez resuspendidos el *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y el *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C. Para el estándar cuantitativo, los ciclos de congelación y descongelación solo son aplicables para el vial reconstituido y sus alícuotas (las diluciones de la curva estándar deben desecharse después de cada uso).

Ambos componentes 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 (ensayo cuantitativo)

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 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 .

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

Para realizar ensayos cualitativos la preparación de diluciones no es necesaria y se recomienda utilizar *Pneumocystis jirovecii* Positive Control para minimizar el riesgo de contaminación cruzada.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo). Se recomienda no rehidratar los pocillos que no se necesiten. Los pocillos no utilizados pueden cortarse fácilmente antes de retirar el aluminio protector y almacenarse como se indica en la Sección Condiciones de Transporte y conservación.
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras a utilizar.
- Pipetear 15 μL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 μL de DNA extraído de cada muestra, de Control Negativo (tubo amarillo) y de Control positivo reconstituido (tubo rojo) para ensayos cualitativos o de las diluciones para la curva estándar (para ensayos cuantitativos) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con las tapas ópticas suministradas. Se recomienda centrifugar brevemente.
- 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
Activación de la polimerasa	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/elongación (*) a través de los canales FAM (*Pneumocystis jirovecii*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado.

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación comprobar la emisión de la señal del control interno.

Se recomienda establecer en cada ensayo los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final. Para ello, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo para cada canal y fije el valor umbral dentro de la fase

exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). En el caso de que el equipo utilizado establezca un umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Una vez fijado el valor umbral, se pueden interpretar las muestras del ensayo.

La naturaleza química de los diferentes fluoróforos puede afectar al valor umbral de los canales, así como las diferentes intensidades de señal pueden influir en el valor umbral para diferentes instrumentos.

Además, se recomienda incluir un blanco (muestra negativa confirmada de la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

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 ($Ct \leq 40$) en el canal FAM (*Pneumocystis jirovecii*).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($Ct > 40$ o no señal) de FAM (*Pneumocystis jirovecii*).

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos del control positivo y control negativo.

El experimento es inválido si hay ausencia de señal en el control positivo o hay señal de amplificación en el control negativo, exceptuando el canal HEX, VIC o JOE que ha de mostrar amplificación (correspondiente al CI). En cualquiera de estos supuestos, el ensayo se debe de repetir.

Análisis cualitativo

Una vez validado el resultado de los controles, para la interpretación de los resultados de las muestras **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas** y con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados:

Control Negativo	Control Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i> FAM	Control Interno HEX	Interpretación
-	+	+	+/- ¹	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA detectado
-	+	-	+ ²	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA No detectado ²
-	+	-	- ²	Inválido ²

Positivo (+): Señal de amplificación ($Ct \leq 40$)

Negativo (-): No hay señal de amplificación ($Ct > 40$ o no señal)

¹ En ocasiones, en el caso de las muestras clínicas, 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación ($Ct \leq 40$ o no señal).

² En el caso de que los genes diana de *Pneumocystis jirovecii* resulten negativos, el Control Interno debe mostrar una señal de amplificación con $Ct \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $Ct > 35$ del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo preferiblemente por duplicado en función del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario, en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas diagnósticas.

Análisis cuantitativo

Usando las diluciones seriadas de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard se puede crear una curva estándar 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 C_t en la curva estándar siguiendo la fórmula:

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

La concentración de las muestras positivas 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 deben incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

En una primera evaluación se analizaron 14 muestras de lavados broncoalveolares y esputo 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). Para esta evaluación se utilizó un sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos (EZ1, Qiagen) y el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). La concordancia entre ambas pruebas fue del 100% mostrando una Especificidad de 1 (0.29-1) y una Sensibilidad de 1 (0.71-1).

Una segunda evaluación se llevó a cabo con un total de 712 muestras de lavados y aspirados broncoalveolares y esputos con sospecha de infección por *Pneumocystis Jirovecii*, utilizando el kit de extracción MagDEA Dx SV kit con el magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) y el equipo LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics). Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* fueron de 10 positivos y 702 negativos, y fueron comparados con el kit RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR (Altona Diagnostics), mostrando una Especificidad de 1 (0.99 -1) y una Sensibilidad de 1 (0.69-1).

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 partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de *Pneumocystis jirovecii* (10^7 - 10^1 copias/reacción) en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción, con una tasa de positivos de $\geq 90\%$.

Veracidad

La veracidad de Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* fue evaluada frente al material de referencia de distintos programas EQAs:

Programa EQA	Variación del patógeno
INSTAND EQA programme "Fungal Genome Detection - <i>Pneumocystis jirovecii</i> " panel (November 2016, June 2017, November 2017, June 2018, May 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2022, 2023)	
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2016, 2017, 2018, 2019, 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2017, 2018, 2019, 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2017, 2018, 2019, 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> j888023

Las cepas de referencia se analizaron con los equipos CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

Precisión

La precisión de Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* fue evaluada mediante diversos ensayos: intra-ensayo (repetibilidad), inter-ensayo (reproducibilidad), ensayo inter-lote (precisión intermedia) y ensayo inter-termociclador (entre laboratorios). Para la extracción de las muestras se utilizó el Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).

La repetibilidad (intra-ensayo) se evaluó analizando réplicas de todas las muestras en la misma carrera utilizando Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	Diana	Canal Vitassay	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	24.63	0.08	0.31
Positivo Bajo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	28.83	0.11	0.36
Muestra LoD	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	34.33	1.04	3.03
Muestra negativa	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	24.96	0.09	0.37
Control Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.45	0.11	0.45
Control Negativo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	24.94	0.11	0.44

Ct = ciclo umbral, \bar{x} = media aritmética del Ct, σ = desviación estándar, CV % = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

La reproducibilidad (inter-ensayo) se evaluó analizando las diferentes muestras en tres días diferentes por tres operadores distintos utilizando Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* con el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	Diana	Canal Vitassay	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.32	0.56	1.75
Positivo Bajo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	33.82	0.64	1.89
Muestra LoD	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.84	0.58	1.61
Muestra negativa	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	25.15	0.32	1.27
Control Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.61	0.15	0.59
Control Negativo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	25.23	0.18	0.70

Ct = ciclo umbral, \bar{x} = media aritmética del Ct, σ = desviación estándar, CV % = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

La precisión intermedia (inter-lote) se evaluó analizando tres réplicas de diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	Diana	Canal Vitassay	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.62	0.31	0.96
Positivo Bajo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	34.33	0.78	2.26
Muestra LoD	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.76	0.10	0.29
Muestra negativa	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	25.11	0.12	0.46
Control Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.49	0.14	0.57
Control Negativo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	25.19	0.29	1.15

Ct = ciclo umbral, \bar{x} = media aritmética del Ct, σ = desviación estándar, CV % = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

Los valores entre laboratorios (inter-termociclador) se evaluaron analizando tres réplicas de la misma muestra utilizadas para los ensayos intra-ensayo, inter-ensayo e inter-lote, utilizando Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii*. El DNA extraído de las muestras, el control positivo y el control negativo fueron analizados juntos en la misma carrera en los equipos CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies) y DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	Diana	Canal Vitassay	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.78	1.33	4.07
Positivo Bajo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.22	2.98	8.47
Muestra LoD	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.82	0.04	0.12
Muestra negativa	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	23.28	2.37	10.20
Control Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.97	0.95	3.66
Control Negativo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Control Interno	HEX	23.22	2.43	10.47

Ct = ciclo umbral, \bar{x} = media aritmética del Ct, σ = desviación estándar, CV % = coeficiente de variación, Neg = negativo, NA = no aplica.

Especificidad analítica

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

Reactividad cruzada		
Adenovirus Type 1	Coronavirus OC43	<i>Legionella longbeache</i>
Adenovirus Type 2, Strain Adenoid 6	Coronavirus SARS-CoV-22019nCoV/USAWA1/2020	<i>Legionella micdadei</i>
Adenovirus Type 3, strain GB	Coronavirus 229E	<i>Legionella pneumophila</i> Serogroup 1
Adenovirus Type 4, strain RI-67	Enterovirus Coxsackievirus A9	Human Metapneumovirus A1
Adenovirus Type 5	Enterovirus Coxsackievirus A24	Human Metapneumovirus A2
Adenovirus Type 8	Enterovirus Coxsackievirus B3	Human Metapneumovirus B2
Adenovirus Type 15, strain CH. 38	Enterovirus Echovirus 30	<i>Moraxella catharralis</i>
Adenovirus Type 31, strain 1315/63 (NIAID V-231-001-014)	Enterovirus Enterovirus 68	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>

Adenovirus Type 40, strain Dugan	Enterovirus Enterovirus 71	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant
Adenovirus Type 41, strain Tak (73-3544)	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Parainfluenza 1
Rhinovirus type C	Influenza A (H3N2) virus. Strain A/Switzerland/9715293/2013 (vaccine strain)	Parainfluenza 2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A (H3N2). Strain A/Thüringen/5/2017 (Clade 3C2a.1). Origin: infected MDCK-cells (lysate)	Parainfluenza 3
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A (H5N8) virus. Strain A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016	Parainfluenza 4
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A (H7N9). Strain A/Anhui/1/2013.	Bocavirus
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A (H1N1 pdm09). Strain A/Michigan/45/2015 (vaccine strain)	RSV A
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A (H1N1) pdm09- virus. Strain A/California/7/2009/ (vaccine strain).	RSV B
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype A	Influenza A, B and H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) ; A/Victoria/210/2009 (H3N2) (Similar strain to A/Perth/16/2009 (H3N2)); B/Brisbane/60/2008	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype C	Influenza A, B and H1N1 A/California/7/2009 (H1N1)PDM09; A/South Australia/55/2014, IVR-175 (Similar strain to Switzerland/9715293/2013 (H3N2)); B/Phuket/3073/2013	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> Strain CM-1	Influenza A, B and H1N1 Strain similar to A/Michigan/45/2015(H1N1) pdm09 (A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180); Strain similar to A/Hong Kong/4801/2014(H3N2) (A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B); Strain similar to B/Brisbane/60/2008 (B/Brisbane/60/2008).	<i>Streptococcus salivarius</i>
Coronavirus HKU	Influenza A/B Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1), Influenza B/Florida/04/06	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus
Coronavirus MERS	<i>Legionella bozemanii</i> Serovar 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Coronavirus NL63	<i>Legionella dumoffii</i>	

Además, la especificidad analítica se analizó utilizando bases de datos de secuencias de nucleótidos públicas y herramientas de búsqueda y/o alineación como:

- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Maftt Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)
- Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Los análisis bioinformáticos mostraron que los cebadores y sondas seleccionados no deberían causar falsos positivos en la detección de *Pneumocystis jirovecii* en presencia de otros organismos.

Por último, en cuanto a interferencias e inhibidores de PCR, cabe destacar que ninguna sustancia endógena o exógena interfiere con el kit Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii*.

Reactividad analítica

La reactividad analítica (inclusividad) de Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* fue confirmada experimentalmente por medio de la amplificación a tiempo real utilizando como molde DNA de las siguientes cepas provenientes de programas EQA, obteniéndose resultados positivos:

Pneumocystis jirovecii Type 1A,

Pneumocystis jirovecii g885652

Pneumocystis jirovecii j888023

Además, la reactividad analítica se analizó utilizando bases de datos de secuencias de nucleótidos públicas y herramientas de búsqueda y/o alineación como:

- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Maftt Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)
- Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Los análisis bioinformáticos mostraron que los cebadores y sondas seleccionados coincidían con secuencias de DNA de *Pneumocystis jirovecii*.

Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 Analyzer (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)
- LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR instrument (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time PCR instrument (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I
- CFX96 Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

^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).

Para más información sobre la compatibilidad del termociclador basada en datos bibliográficos y los canales de detección más comunes, contactar con el fabricante (info@vitassay.com).

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

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Limitaciones

- Esta prueba 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, aspirados broncoalveolares y esputos. El uso de otro tipo de muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; los ácidos nucleicos deben ser extraídos 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.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados.
- En ocasiones se pueden detectar ácidos nucleicos molde diana con un número de copias inferior al límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Pneumocystis jirovecii*, ya sea por el control positivo o el Quantitative Standard durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de los ácidos nucleicos molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de los ácidos nucleicos); c) Degradación de los ácidos nucleicos durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga del microorganismo esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante; g) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de cepas nuevas o desconocidas.
- La detección de los ácidos nucleicos no implica la presencia de microorganismos viables y/o infecciosos ni que estos microorganismos sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por *Pneumocystis jirovecii* y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimas para la identificación de *Pneumocystis jirovecii* y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar los microorganismos.
- Si los datos clínicos del paciente y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con estos microorganismos, y se han descartado otras enfermedades respiratorias con pruebas de laboratorio, la posibilidad de un resultado falso negativo no debería desestimarse y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR (incluso si es el mismo modelo), el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- Se recomienda incluir un blanco de muestra durante el proceso de extracción y qPCR para descartar posibles contaminaciones y evitar no detectar resultados falsos positivos probables.



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 <i>Pneumocystis jirovecii</i> 4x8-well strip, low profile	7041026
Vitassay qPCR <i>Pneumocystis jirovecii</i> 4x8-well strip, high profile	7042026

Provided Reagents

In references 7041026 and 7042026:

Reference	Reagent/material	Description	Concentration Range	Color	Amount
7041S026/ 7042S026	Pneumocystis <i>jirovecii</i> strips low/high profile	Lyoprotectors and Stabilizers	± 6 g/100 mL *	-	4 x 8-well strips
		dNTPs	± 1 mM *		
		Primers and Probes	0,2-1 nMol/ μ L *		
		Enzymes	10-100 U/rxn *		
7C026	Pneumocystis <i>jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	$1,9 \times 10^4$ copies/ μ L *	red	1 vial
7Q026	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative standard	Quantitative Standard	2×10^7 copies/ μ L *	red	1 vial
7001A	PCR grade water	RNAsa/DNAsa free water	1 g/mL	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Saline Solution	± 13 mM	green	1 vial x 1,8 mL
		Buffer (TRIS, pH)	± 67 mM		
7003N	Negative control	RNAsa/DNAsa free water	1 g/mL	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	Optical caps for sealing strips during thermal cycling	-	-	4 x 8-cap strips

* For component in stabilized format, the concentration range means after rehydration.

Material and equipment required, not provided

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or \leq -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- Blank sample (See DNA extraction)

Transport and storage

- Transport and storage of the kits (before use) can be performed at 2-40°C until the expiry date stated on the label. Once in use, see storage conditions for each component. Avoid shaking during transport to prevent liquid leakage.
- The resuspended positive control and Quantitative Standard should be stored at -20°C until the expiry date stated on the kit label. The stability of the positive control and Quantitative Standard has been validated after 6 freeze-thaw cycles. However, it is recommended to distribute in aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles.
- For the quantitative standard, freeze-thaw cycles are only applicable for the reconstituted vial and its aliquots. For proper use of the product, dilutions of the standard curve must be discarded after each use.
- For proper use of the kit, it is recommended that unneeded wells are not rehydrated. Unused wells can be easily cut before removing the protective foil and stored in the foil bags provided with the silica gel inside and closed with the zip closure to avoid contact with light or moisture and stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label. Once the wells have been rehydrated, nucleic acid addition and qPCR should be performed immediately.
- Once opened, the Resuspension buffer, PCR grade water and Negative Control components should be stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label.
- Keep all reagents in the darkness.

Summary

Pneumocystis jirovecii (PJ) is an opportunistic fungal pathogen that can cause severe pneumonia in immunocompromised hosts. Risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PJP) include HIV, organ transplant, malignancy, certain inflammatory or rheumatologic conditions, and associated therapies and conditions that result in cell-mediated immune deficiency (Weyant et al. 2021).

The signs and symptoms of this PJP are non-specific and include progressive dyspnea, low-grade fever, non-productive cough, hypoxemia, as well as diffuse dry rales on examination (Weyant et al. 2021).

The cyst form of *Pneumocystis* is spread through the air from person-to-person. In the host the cysts are received in the lungs, and in most cases their presence is asymptomatic. Cases of PJP can be due to reactivation of latent infection or de-novo person-person transmission (especially in outbreaks). This high rate of colonization and asymptomatic transmission allows for the immunocompetent to act as unknowing reservoirs for the pathogen (Weyant et al. 2021).

The prevalence of PJP has significantly decreased in people living with HIV thanks to combined antiretroviral therapy (cART) and the standard practice of prescribing prophylaxis. Even with treatment, the mortality in PJP is high, and it is higher in non-HIV patients (20–50%) than in people living with HIV (10–30%) (Weyant et al. 2021). Non-HIV patients may present with a rapidly progressing disease likely due to an intense immune response to PJP in the lungs than in HIV patients (Ibrahim et al. 2023). Although most patients will improve with appropriate treatment, some develop progressive respiratory failure. The mortality among patients requiring intensive care admission or mechanical ventilation is reported to be as high as 60% (Truong et al. 2023).

The differential diagnosis of PJP includes acute respiratory distress syndrome, tuberculosis, cytomegalovirus (CMV), *Legionella* pneumonia, mycoplasma pneumonia, other viral or bacterial pneumonias, pulmonary embolism, lymphocytic interstitial pneumonia, and coronavirus disease 2019 infection (Ibrahim et al. 2023). As the clinical signs of PJP are nonspecific, definitive diagnosis requires direct detection of the organism in lower respiratory secretions or tissue (Weyant et al. 2021).

Workup of PJP typically involves a combination of pulmonary imaging, biochemical tests, and appropriate respiratory samples for analysis (Weyant et al. 2021). Traditional diagnostic testing has relied on staining and direct visualization of the life-forms in bronchoalveolar lavage fluid. This method has proven insensitive, and invasive procedures may be needed to obtain adequate samples. Molecular methods of detection such as polymerase chain reaction (PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and antibody-antigen assays have been developed in an effort to solve these problems. These techniques are very sensitive and have the potential to detect *Pneumocystis* life-forms in non-invasive samples such as sputum, oral washes, nasopharyngeal aspirates, and serum (Bateman et al. 2020).

Test principle

Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* is based on the real-time amplification of a conserved region of the mitochondrial *large-subunit* ribosomal RNA (*mtLSU* rRNA) gene of *Pneumocystis jirovecii* genome. After DNA extraction, *P. jirovecii* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, following hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR

equipment. Additionally, quantification of *P. jirovecii* DNA can be performed by creating a standard curve from the Pneumocystis jirovecii Quantitative Standard included in the kit.

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 and checks whether the amplification reaction is working correctly. The detection channels of the target sequences are described as follows:

Target	Detection channel
<i>mtLSU</i> rRNA gene (<i>P. jirovecii</i>)	FAM
Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE (depending on the equipment used)

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use the kit after the expiration date.
- Do not use the kit without having read and understood the information on procedures, precautions, and limitations provided in the instructions for use.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if the package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Use the strips immediately after removing the protective foil to protect the reaction mixture from sunlight. It is not recommended to leave the strips open without resuspending. Once the required wells have been rehydrated, the qPCR assay should be performed immediately.
- It is recommended to cut the required/necessary wells before removing the protective seal from the entire strip. Store the rest inside the bag with the desiccant.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (do not remove the desiccant from the pouches). Remove excess air from the bags before sealing.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Rehydrate the vials immediately after opening the Positive Control and Quantitative Standard envelope and use them in the PCR reaction or store them properly. Leaving the vial open without resuspending may cause deterioration of the reagent.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area. Once the test is completed wash your hands thoroughly.
- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended. A new tip should be used for each sample. It is necessary to change gloves before handling the reagents.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- The product Vitassay qPCR Pneumocystis jirovecii has only been validated with the equipment mentioned in Section Compatibles real-time PCR equipment of this Instructions for Use.
- You must ensure that the conditions are set up in the thermal cycler according to the instructions in section "Programme your thermocycler".
- Refer to Safety data sheets, available on request.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport the conditions validated by the user must be followed. Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* has been tested in respiratory samples (bronchoalveolar lavage fluid, bronchoalveolar aspirates, and sputum). Other sample types must be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected properly in clean containers with or without transport media (depending on sample type), labelled correctly and be processed as soon as possible to guarantee the test quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 2h or at 4°C for up to 7 days and for long term transport (more than 7 days), it is recommended shipping at -20°C or lower. The samples can be stored at 4°C for up to 7 days or frozen at -20°C or lower (ideally at -80°C) for conservation during a long time. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

DNA extraction

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

- EZ1 Virus Mini Kit, using the EZ1 instrument (Qiagen)
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega), using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

For the use of DNA extraction kits other than those mentioned above, validation must be performed by the end user, following the manufacturer's instructions for use.

It should be noted that the positive and negative control should not be extracted. To monitor and control the extraction process and rule out possible contamination, a sample blank (not supplied in the kit) can be extracted, which should consist of the same matrix as the clinical samples (real or simulated matrix), and previously characterized as negative for all targets.

Positive control and quantitative standard preparation

Reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red tube) with 400 µL of PCR grade water (white tube) and the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tubes thoroughly.

Once the *Pneumocystis jirovecii* Positive Control and the *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard have been resuspended, dispense them into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C. For the quantitative standard, freeze-thaw cycles are only applicable for the reconstituted vial and its aliquots (dilutions of the standard curve should be discarded after each use).

Both components contain a high-copy number template and entail a very significant contamination risk. Therefore, we recommend opening and manipulating them in a separate area of the laboratory away from the other components and samples.

Standard Curve Preparation (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 (red tube, which contains approximately 2×10^7 copies/µL*). The contents of this vial will be the standard with the highest concentration from which the rest of the serial dilutions will be prepared as indicated below:

- 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/µL. Mix by vortex and centrifuge briefly.
- Add 10 µL of standard with 2×10^6 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 further details refer to the “Certificate of Analysis”, for the lot number and DNA copy number of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard.

For qualitative assays, the preparation of dilutions is not necessary and it is recommended to use *Pneumocystis jirovecii* Positive Control to minimize the risk of cross-contamination.

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.
It is recommended not to rehydrate wells that are not needed. Unused wells can be easily cut before removing the protective foil and stored as indicated in the Transport and Storage Section.
- Peel off the protective aluminum seal from the strips to be used.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA extracted from each sample, of negative control (yellow tube) and of reconstituted positive control (red tube) for qualitative assays or dilutions for the standard curve (for quantitative assays), and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the optical caps provided. It is recommended to spin down briefly.
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	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 annealing/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.

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is performed by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer’s instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control signal emission.

For each assay, it is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. To do so, select the well corresponding to the positive control for each channel and set the threshold value within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). In case a threshold is set automatically by the equipment used, check, and verify that it is adjusted to the positive control or adjust it manually. Once the threshold value is set, the test samples can be interpreted.

The chemical nature of the different fluorophores can affect the threshold value of the channels, just as different signal intensities can influence the threshold value for different instruments.

In addition, it is recommended to include a blank (confirmed negative sample from the same matrix as the samples tested) for the detected targets in order to establish the baseline of the assay.

For a valid diagnostic test run, before analysing the result of the clinical samples, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve (Ct ≤40) in FAM channel (*Pneumocystis jirovecii*), which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show the absence of signal (Ct >40 or no signal) in FAM (*Pneumocystis jirovecii*), which validates the reaction.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in the positive control and negative control wells.

The experiment is invalid if there is no signal in the positive control or there is amplification signal in the negative control, except for the HEX, JOE or VIC channel which should show amplification signal (corresponding to Internal Control). In either case, the assay must be repeated.

Qualitative analysis

Once the results of the controls have been validated, for the interpretation of the sample results **select only the channels where the targets are detected**. The result interpretation is summarized in the following table:

Negative Control	Positive Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i> FAM	Internal Control HEX	Interpretation
-	+	+	+/- ¹	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA detected
-	+	-	+ ²	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA Not detected ²
-	+	-	- ²	Invalid ²

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

¹ Sometimes, in the case of clinical samples, detection of the internal control is not necessary as the presence of a high initial copy number of the target nucleic acid may cause preferential amplification of the target nucleic acid. The internal control (IC) either shows or does not show an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

² In case the *Pneumocystis jirovecii* target genes are negative, the Internal Control should show an amplification signal with Ct ≤ 35. In case of no signal or Ct value > 35 of the internal control, the result is considered "invalid" and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1: 100, or to re-extract and repeat the assay to check for possible failure of the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the result obtained is unclear or doubtful, it is necessary to check that all steps have been performed correctly, verify the correct performance of each qPCR step, check all parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. If the situation is not resolved, it is recommended to repeat the test preferably in duplicate depending on the available material: (a) obtain a new specimen, re-extract and re-test (ideal), (b) re-extract and re-test another aliquot of the same sample, or (c) repeat the qPCR with the same isolated DNA sample.

The test results should be evaluated by a healthcare professional, in the context of the medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

Quantitative analysis

Using the serial dilutions of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard a standard curve can be created according to the formula:

$$\text{Ct} = m \log (\text{Q}) + b \quad \text{Where:} \quad \begin{array}{l} \text{Ct} = \text{Threshold Cycle} \\ m = \text{Slope} \\ \text{Q} = \text{Concentration} \\ b = \text{Intercept} \end{array}$$

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 positive 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

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

In a first assessment, the clinical performance of Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* was evaluated using 14 bronchoalveolar lavage and sputum from patients with suspicious of *Pneumocystis pneumonia*. We obtained a positive result for 11 samples and a negative result for 3 of them. The obtained results with Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* were compared with other real-time PCR commercial kit (FTD *Pneumocystis jirovecii*, Fast-track Diagnostics). An automated nucleic acid extraction system (EZ1, Qiagen) and the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) were used for this evaluation. The concordance between both tests was 100% showing a Specificity of 1 (0.29-1) and a Sensitivity of 1 (0.71-1).

A second evaluation was carried out on a total of 712 samples of bronchoalveolar lavages and aspirates and sputum with suspected *Pneumocystis jirovecii* infection, using the MagDEA Dx SV extraction kit with the magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) and the LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics). The results obtained with Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* were 10 positive and 702 negative and were compared with the RealStar® *Pneumocystis jirovecii* PCR kit (Altona Diagnostics), showing a Specificity of 1 (0.99 -1) and a Sensitivity of 1 (0.69-1).

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 the template DNA of *Pneumocystis jirovecii* (10^7 - 10^1 copies / reaction) in CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) equipment. This assay has a limit of detection of 10 copies of DNA per reaction, with a positive rate of ≥90%.

Veracity

The trueness of Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* was evaluated against reference material from different EQA programmes:

EQA Program	Pathogen variety
INSTAND EQA programme "Fungal Genome Detection - <i>Pneumocystis jirovecii</i> " panel (November 2016, June 2017, November 2017, June 2018, May 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii pneumonia</i> (PCP) DNA EQA Programme (2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2022, 2023)	
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii pneumonia</i> (PCP) DNA EQA Programme (2016, 2017, 2018, 2019, 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii pneumonia</i> (PCP) DNA EQA Programme (2017, 2018, 2019, 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii pneumonia</i> (PCP) DNA EQA Programme (2017, 2018, 2019, 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> j888023

Reference strains were analysed with the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

Precision

The accuracy of Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* was evaluated by several assays: intra-assay (repeatability), inter-assay (reproducibility), inter-batch assay (intermediate precision) and inter-thermocycler assay (inter-laboratory). The Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex) was used for sample extraction.

The repeatability (intra-assay) was assessed by testing replicates of all samples in the same run using Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* on the AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). The obtained results were as follows:

Sample	Target	Vitassay channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	24.63	0.08	0.31
Low Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	28.83	0.11	0.36
LoD sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	34.33	1.04	3.03
Negative sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	24.96	0.09	0.37
Positive Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.45	0.11	0.45
Negative Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	24.94	0.11	0.44

Ct = threshold cycle, \bar{x} = arithmetic mean of Ct, σ = standard deviation, CV % = coefficient of variation, **Neg** = negative, **NA** = not applicable.

The reproducibility (inter-assay) was assessed by testing the different samples on three different days by three different operators using Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* with the AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). The obtained results were as follows:

Sample	Target	Vitassay channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.32	0.56	1.75
Low Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	33.82	0.64	1.89
LoD sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.84	0.58	1.61
Negative sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	25.15	0.32	1.27
Positive Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.61	0.15	0.59
Negative Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	25.23	0.18	0.70

Ct = threshold cycle, \bar{x} = arithmetic mean of Ct, σ = standard deviation, CV % = coefficient of variation, **Neg** = negative, **NA** = not applicable.

The intermediate precision (inter-batch) was assessed by testing three replicates of different samples using three batches of Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* on the AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). The obtained results were as follows:

Sample	Target	Vitassay channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.62	0.31	0.96
Low Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	34.33	0.78	2.26
LoD sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.76	0.10	0.29
Negative sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	25.11	0.12	0.46
Positive Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.49	0.14	0.57
Negative Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	25.19	0.29	1.15

Ct = threshold cycle, \bar{x} = arithmetic mean of Ct, σ = standard deviation, CV % = coefficient of variation, **Neg** = negative, **NA** = not applicable.

The inter-laboratory values (inter-thermocycler) were assessed by analysing three replicates of the same sample used for intra-assay, inter-assay, and inter-batch assays, using Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii*. The DNA extracted from the samples, the positive control and the negative control were analysed together in the same run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies) and DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). The obtained results were as follows:

Sample	Target	Vitassay channel	\bar{x} (Ct)	σ	CV%
Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.78	1.33	4.07
Low Positive	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.22	2.98	8.47
LoD sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	35.82	0.04	0.12
Negative sample	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	23.28	2.37	10.20
Positive Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	25.97	0.95	3.66
Negative Control	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	Neg	NA	NA
	Internal Control	HEX	23.22	2.43	10.47

Ct = threshold cycle, \bar{x} = arithmetic mean of Ct, σ = standard deviation, CV % = coefficient of variation, Neg = negative, NA = not applicable.

Analytical specificity

The analytical specificity (Cross-Reactivity) for *Pneumocystis jirovecii* detection was confirmed by experimentally testing a panel composed of the following microorganisms, and no cross-reactions were observed between any of the species.

Cross-Reactivity		
Adenovirus Type 1	Coronavirus OC43	<i>Legionella longbeache</i>
Adenovirus Type 2, Strain Adenoid 6	Coronavirus SARS-CoV-22019nCoV/USAWA1/2020	<i>Legionella micdadei</i>
Adenovirus Type 3, strain GB	Coronavirus 229E	<i>Legionella pneumophila</i> Serogroup 1
Adenovirus Type 4, strain RI-67	Enterovirus Coxsackievirus A9	Human Metapneumovirus A1
Adenovirus Type 5	Enterovirus Coxsackievirus A24	Human Metapneumovirus A2
Adenovirus Type 8	Enterovirus Coxsackievirus B3	Human Metapneumovirus B2
Adenovirus Type 15, strain CH. 38	Enterovirus Echovirus 30	<i>Moraxella catharralis</i>
Adenovirus Type 31, strain 1315/63 (NIAID V-231-001-014)	Enterovirus Enterovirus 68	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Adenovirus Type 40, strain Dugan	Enterovirus Enterovirus 71	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Mycobacterium tuberculosis not rifampin resistant
Adenovirus Type 41, strain Tak (73-3544)	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Parainfluenza 1
Rhinovirus type C	Influenza A (H3N2) virus. Strain A/Switzerland/9715293/2013 (vaccine strain)	Parainfluenza 2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A (H3N2). Strain A/Thüringen/5/2017 (Clade 3C2a.1). Origin: infected MDCK-cells (lysate)	Parainfluenza 3
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A (H5N8) virus. Strain A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016	Parainfluenza 4
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A (H7N9). Strain A/Anhui/1/2013.	Bocavirus
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A (H1N1 pdm09). Strain A/Michigan/45/2015 (vaccine strain)	RSV A
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A (H1N1) pdm09- virus. Strain A/California/7/2009/ (vaccine strain).	RSV B

<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype A	Influenza A, B and H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) ; A/Victoria/210/2009 (H3N2) (Similar strain to A/Perth/16/2009 (H3N2)); B/Brisbane/60/2008	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype C	Influenza A, B and H1N1 A/California/7/2009 (H1N1)PDM09; A/South Australia/55/2014, IVR-175 (Similar strain to Switzerland/9715293/2013 (H3N2)); B/Phuket/3073/2013	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> Strain CM-1	Influenza A, B and H1N1 Strain similar to A/Michigan/45/2015(H1N1) pdm09 (A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180); Strain similar to A/Hong Kong/4801/2014(H3N2) (A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B);Strain similar to B/Brisbane/60/2008 (B/Brisbane/60/2008).	<i>Streptococcus salivarius</i>
Coronavirus HKU	Influenza A/B Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1), Influenza B/Florida/04/06	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus
Coronavirus MERS	<i>Legionella bozemanii</i> Serovar 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Coronavirus NL63	<i>Legionella dumoffii</i>	

In addition, analytical specificity was analysed using public nucleotide sequence databases and search and/or alignment tools such as:

- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Mafft Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)
- Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

The bioinformatics analysis showed that the selected primers and probes should not cause false positives in the detection of *Pneumocystis jirovecii* in the presence of other organisms.

Finally, regarding PCR interferences and inhibitors, it should be noted that no endogenous or exogenous substances interfere with the Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* kit.

Analytical reactivity

The analytical reactivity (inclusivity) of Vitassay qPCR *Pneumocystis jirovecii* was experimentally confirmed by real-time amplification using DNA from the following strains from EQA programmes as template, with positive results:

Pneumocystis jirovecii Type 1A,

Pneumocystis jirovecii g885652

Pneumocystis jirovecii j888023

In addition, analytical reactivity was analysed using public nucleotide sequence databases and search and/or alignment tools such as:

- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Mafft Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)
- Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

The bioinformatics analysis showed that the selected primers and probes matched *Pneumocystis jirovecii* DNA sequences.

Compatible real-time PCR equipment

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

- Cobas Z480 Analyzer (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)
- LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR instrument (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time PCR instrument (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I
- CFX96 Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

^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).

For more information regarding thermocycler compatibility based on bibliographic data and the most common detection channels contact the manufacturer (info@vitassay.com).

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

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

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* infection. All results obtained should be interpreted by a specialist together with the available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been tested on bronchoalveolar lavage, bronchoalveolar aspirate and sputum samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper nucleic acids from respiratory clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Possible crosstalk might be observed in empty channels of the thermocycler if there is no target to be detected, so it is required to select only the channels where these are amplified when interpretation of results is performed.
- Occasionally, target template nucleic acids with a copy number below the detection limit can be detected, but the results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Pneumocystis jirovecii*, either by the positive control or the Quantitative standard during reconstitution, by samples containing high concentrations of target nucleic acids or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including nucleic acids extraction); c) nucleic acids degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) microorganism load is below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or

immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures; g) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of new or unknown strains.

- The detection of nucleic acids does not imply the presence of viable and/or infectious microorganisms or that these microorganisms are the causative agents of clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *Pneumocystis jirovecii* infection and should not be the sole basis for a patient management/treatment decision. The optimal specimen types for *Pneumocystis jirovecii* identification and/or the most appropriate stage of infection for collection have not yet been established. Consider collecting multiple samples from the same patient at different times, which may increase the likelihood of detecting the microorganism(s).
- If the patient's clinical data, and epidemiological studies suggest possible infection by these microorganisms, and other respiratory diseases have been discarded with laboratory tests, a false negative result might not be dismissed, and additional tests should be performed.
- The fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment (even if it is the same model), extraction system, sample type, and pretreatment, among others.
- It is recommended to include a sample blank during the extraction and qPCR process to rule out possible contamination and to avoid missing probable false positive results.

Bibliography/Bibliografía












1. Truong J, Ashurst JV. (2023) *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. Jan 21. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–.
2. Weyant RB, Kabbani D, Doucette K, Lau C, Cervera C. (2021) *Pneumocystis jirovecii*: a review with a focus on prevention and treatment. *Expert Opin Pharmacother*. Aug;22(12):1579-1592. Epub 2021 Apr 19.
3. Ibrahim A, Chattaraj A, Iqbal Q, Anjum A, Rehman MEU, Aijaz Z, Nasir F, Ansar S, Zangeneh TT, Iftikhar A. (2023) *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Review of Management in Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Non-HIV Immunocompromised Patients. *Avicenna J Med*. Mar 24;13(1):23-34.
4. Bateman M, Oladele R, Kolls JK. (2020) Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A review of current methods and novel approaches. *Med Mycol*. Nov 10;58(8):1015-1028.

Trademarks/Marcas registradas

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Todas las marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a sus respectivos propietarios.

Symbols for components and reagents / Símbolos para reactivos y productos

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>Producto para diagnóstico in vitro</i>		Contains sufficient for <n> test <i>Contiene <n> test</i>		Catalogue number <i>Número de referencia</i>		Keep dry <i>Almacenar en lugar seco</i>		Manufacturer <i>Fabricante</i>
	Consult instructions for use <i>Consultar las instrucciones de uso</i>		Batch code (yyyy-xxx) <i>Número de lote (yyyy-xxx)</i>		Use by (yyyy-mm-dd: year-month-day) <i>Fecha de caducidad (yyyy-mm-dd: año-mes-día)</i>		Temperature limitation <i>Limitación de temperatura</i>		Volume <i>Volumen</i>
	CE marking <i>Marcado CE</i>								

Change Control / <i>Control de cambios</i>		
Version Nº / <i>Versión Nº</i>	Changes / <i>Cambios</i>	Date / <i>Fecha</i>
00	Original versión / Versión original	09/03/2017
01	Editorial improvement, error correction, addition of precautions and limitations, update of technical characteristics, thermocyclers and information in Annex I and addition of Annexes II and III / Mejora editorial, corrección errores, adición precauciones y limitaciones, actualización características técnicas, termocicladores e información anexo I y adición anexos II y III	04/12/2019
02	Increased amount of Resuspension buffer / Mayor cantidad de Resuspension buffer	29/05/2020

03	New format, editorial improvement and better explanation of some sections, more information regarding material, reagents, transport and conservation, bibliographic information update, addition of some precautions, recommendations and limitations, Positive control rehydration procedure update, technical characteristics update in line with monitoring assessments, deletion of Attached I and II / Nuevo formato, mejora de la redacción y mejor explicación de algunas secciones, más información sobre el material, los reactivos, el transporte y la conservación, actualización de la información bibliográfica, adición de algunas precauciones, recomendaciones y limitaciones, actualización del procedimiento de rehidratación de control positivo, actualización de las características técnicas de acuerdo con las evaluaciones de seguimiento, supresión de los Anexos I y II.	27/11/2023
----	--	------------

Real-Time PCR Kits



VA Vitassay

identifying pathogens worldwide

Vitassay Healthcare, S.L.U

Parque Tecnológico Walqa

Ctra. N-330 Km. 566

22197 Huesca (Spain)

Ph. (+34) 974 001 193

info@vitassay.com

www.vitassay.com

F09-81 Rev.00