

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Pneumocystis jirovecii

CE IVD



These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, low profile	VS-JIR102L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, high profile	VS-JIR102H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-JIR106L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-JIR106H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-JIR112L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-JIR112H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-JIR113L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-JIR113H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 4 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR102
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR136
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR172

Table A 1. References for Open format with internal control products. / Referencias para productos Open Format con control interno.

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-JIR196T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 3) / OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, low profile	VS-JIR102LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, high profile	VS-JIR102HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-JIR106LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-JIR106HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-JIR112LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-JIR112HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-JIR113LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-JIR113HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 4 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR102E
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR136E
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR172E

Table A 3. References for Open format with extraction control products. / Referencias para productos Open Format con control de extracción.

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 4) / FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-JIR196TE

Table A 4. References for Tube format with extraction control products. / Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.

NOTE: Instructions For Use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Las instrucciones de uso (IFU) se incluyen en el kit en versión inglés/español.

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

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.

Content

1.	Intended purpose	8
2.	Summary and Explanation	8
3.	Principle of the procedure	9
4.	Reagents provided	9
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	9
6.	Transport, storage and use conditions	10
7.	Precautions for users	11
8.	Test procedure.....	13
8.1.	Specimen collection, transport and storage	13
8.2.	DNA extraction	14
8.3.	Standard curve preparation for quantitative assay	15
9.	Result interpretation	15
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2).....	15
9.1.1	Qualitative assay	15
9.1.2	Quantitative assay	17
9.2.	References with extraction control (references in Annex 3 and 4)	18
9.2.1	Qualitative assay	18
9.2.2	Quantitative assay	20
10.	Limitations of the test	20
11.	Quality control	22
12.	Analytical performance characteristics	22
12.1.	Analytical linearity and Analytical sensitivity (Limit of Detection (LoD))	22
12.2.	Accuracy.....	22
12.2.1.	Trueness (Veracity)	22
12.2.2.	Precision.....	23
12.3.	Analytical specificity and reactivity	25
12.3.1.	Analytical Specificity	25
12.3.1.1.	Cross-reactivity and exclusivity assay.....	25
12.3.2.	Analytical reactivity	26
13.	Clinical performance characteristics.....	27
	ANNEX 1	29
A1.1	Principle of the procedure	29
A1.2	Reagents provided	29

A1.3 Test procedure	31
A1.3.1 Lyophilized positive control and quantitative standard	31
A1.3.2 PCR protocol	31
ANNEX 2	33
A2.1 Principle of the procedure	33
A2.2 Reagents provided	33
A2.3 Test procedure	33
A2.3.1 Lyophilized positive control and quantitative standard	33
A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube	34
A2.3.3 PCR protocol	34
ANNEX 3	36
A3.1 Principle of the procedure	36
A3.2 Reagents provided	36
A3.3 Test procedure	38
A3.3.1 Lyophilized extraction control	38
A3.3.2 Lyophilized positive control and quantitative standard	38
A3.3.3 PCR protocol	39
ANNEX 4	40
A4.1 Principle of the procedure	40
A4.2 Reagents provided	40
A4.3 Test procedure	41
A4.3.1 Lyophilized extraction control	41
A4.3.2 Lyophilized positive control and quantitative standard	41
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube	41
A4.3.4 PCR protocol	42

Contenido

1. Finalidad prevista	43
2. Introducción y explicación	43
3. Procedimiento	44
4. Reactivos suministrados	44
5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario	44
6. Condiciones de transporte y almacenamiento	45
7. Precauciones para el usuario	47

8.	Procedimiento del test.....	49
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras.....	49
8.2.	Extracción de DNA.....	49
8.3.	Preparación de una curva estándar para ensayos cuantitativos	50
9.	Interpretación de resultados.....	51
9.1.	Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	51
9.1.1.	Ensayo cualitativo.....	51
9.1.2.	Ensayo cuantitativo	53
9.2.	Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	54
9.2.1.	Ensayo cualitativo	54
9.2.1.	Ensayo cuantitativo	56
10.	Limitaciones del test.....	56
11.	Control de calidad.....	58
12.	Características del funcionamiento analítico	58
12.1.	Linealidad analítica y Sensibilidad analítica (Límite de Detección (LoD))	58
12.2.	Exactitud.....	58
12.2.1.	Veracidad (Sesgo)	58
12.2.2.	Precisión	59
12.3.	Especificidad y reactividad analítica	61
12.3.1.	Especificidad analítica	61
12.3.1.1.	Reactividad cruzada y ensayo de exclusividad	61
12.3.2.	Reactividad analítica	62
13.	Características del funcionamiento clínico	63
	ANEXO 1	64
A1.1	Procedimiento.....	64
A1.2	Reactivos suministrados	64
A1.3	Procedimiento del test	66
A1.3.1	Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo	66
A1.3.2	Protocolo PCR	66
	ANEXO 2	68
A2.1	Procedimiento.....	68
A2.2	Reactivos suministrados	68
A2.3	Procedimiento del test	68
A2.3.1	Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo	68
A2.3.2	Mezcla de reacción liofilizada	69

A2.3.3 Protocolo PCR	69
ANEXO 3	71
A3.1 Procedimiento.....	71
A3.2 Reactivos suministrados	71
A3.3 Procedimiento del test	73
A3.3.1 Control de extracción liofilizado	73
A3.3.2 Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo	73
A3.3.3 Protocolo PCR	74
ANEXO 4	75
A4.1 Procedimiento.....	75
A4.2 Reactivos suministrados	75
A4.3 Procedimiento del test	76
A4.3.1 Control de extracción liofilizado	76
A4.3.2 Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo	76
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	76
A4.3.4 Protocolo PCR	77
Bibliography/Bibliografía	78
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	78
Trademarks.....	78

ENGLISH

1. Intended purpose

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit is designed for qualitative and quantitative detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *Pneumocystis jirovecii*.

2. Summary and Explanation

Pneumocystis carinii pneumonia (PCP), known also as *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, is a fungal infection that most commonly affects immunocompromised persons and, in some cases, can be severely life-threatening.

Classic signs and symptoms of *Pneumocystis* infection include dyspnea, a dry cough, rapid breathing, fever, chills, sweats, fatigue, and cyanosis—symptoms that can easily be confused with those of tuberculosis (TB). Disseminated *Pneumocystis* infection is very rare. Immunosuppression, short-term or long-term corticosteroid use, and the presence of chronic lung disease are the primary risk factors for infection with *Pneumocystis* species. (Harris, J.R., et al., 2010).

With regard to the transmission, *Pneumocystis jirovecii* is thought to be transmitted from person to person through an airborne route. Asymptomatic lung colonization can occur in people with normal immune systems, and they may unknowingly become reservoirs (asymptomatic carriers) for the spread of *Pneumocystis* to immunocompromised individuals (Truong J, Ashurst JV., 2023).

Pneumocystis jirovecii is extremely difficult to culture and traditionally has been diagnosed based on clinical symptoms and radiographic visualisation with the following confirmation with the visualization of the stained organism. Thus, there is a growing interest in alternative methods, such as Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Flow cytometry, Antibody assays, Antigen and biomarkers assays and PCR-based diagnostic methods, which are presented as a good alternative due to the high specificity and sensitivity rates, and the reduction of diagnosis times.

With the advent of more sensitive diagnostic tests, *Pneumocystis jirovecii* is increasingly identified in asymptomatic individuals or those without the symptoms classically associated with PCP. This phenomenon has been termed colonisation and, although it affects 9-69% of immunocompromised patients, its clinical significance is unknown. There is a high concern that colonisation may increase the risk of progression to PCP, and the phenotypes that progress are not well defined. Progression of *Pneumocystis jirovecii* colonisation to PCP in immunocompromised patients is highly likely. Identification of patients at increased risk of progression and initiation of prophylaxis or treatment may prevent significant morbidity and mortality. (Marjorie Bateman, et al., 2020).

3. Principle of the procedure

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

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal, which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms. In addition, quantification of specific *Pneumocystis jirovecii* DNA can be achieved by generating of a standard curve using the *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard provided with the kit.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contains all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an **internal or extraction control** to verify the correct functioning of the amplification mix.

The internal control (IC) verifies if the amplification reaction works properly. If the PCR reaction is inhibited due to the presence of an artifact/inhibitor or because the well is incorrectly rehydrated, this control may become negative.

The extraction control (EC) monitors the efficiency of the extraction method and verifies the PCR reaction. It is supplied in an additional vial and must be added to the samples before the extraction process.

4. Reagents provided

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products, Annex 2 for tube format with internal control products, Annex 3 for open and rotor-gene format with extraction control products and Annex 4 for tube format with extraction control products.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2 and 4).
- Blank sample (See section 8.2 DNA extraction).

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit was tested with the following equipments: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), CFX96 Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology), DTlite real-time PCR instrument (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics), SmartCycler® (Cepheid), VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L) and Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics).

To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with VIASURE Real Time PCR Detection Kits.

This assay has been validated with the following exposure values:

- DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel - 1000, ROX channel - 1000 and Cy5 channel -1000.
- DTlite real-time PCR instrument (DNA-Technology): FAM channel -500, HEX channel - 500, ROX channel - 500 and Cy5 channel -500.

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

6. Transport, storage and use conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the kit label.
- Avoid vibrations during transport to prevent liquid leakage.
- Once the positive control and Quantitative Standard has been re-suspended, store it at -20°C until the expiration date stated on the kit label. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control and Quantitative Standard have been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- For Quantitation Standard, stability to freeze and thaw cycles is only applicable for the reconstituted vial or its aliquots. During correct use of the product, standard curve dilutions must be discarded after each use.
- For Tube format kits: Once the *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C or 4°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at -20°C until the expiration date stated on the kit label, and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times). Once the tube is opened or rehydrated, it must be stored to keep the vial away from light.
- For open format kits (strips): For proper use of the kit, it is recommended not to rehydrate additional unused wells. If all the provided wells in an 8-well strip are not used, the required number of reaction wells can be

easily cut from 8-well strips. If not all wells are used, it is recommended that unused wells be stored in the provided foil bags with the silica gel inside to prevent contact with light until use. The open bag with not rehydrated wells at 2-40°C is stable for up to 24 months.

- For strips: Once the required wells are rehydrated, the addition of nucleic acid and performance of the qPCR must be carried out immediately.
- Once Extraction Control tube has been reconstituted, use it immediately or store at –20°C until the expiration date stated on the kit label, and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

The following table summarises the conditions for transport, storage and use of the overall kit and each component:

Component	Transport Conditions	Storage Conditions	In-use conditions
Entire VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit.	2-40°C during the shelf life stated in the label.	Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	* See in-use conditions of each component.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> well-strip (See Annex 1 and 3).		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Non-rehydrated wells in an open pouch with the silica gel: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction mix tube (see Annex 2 and 4).		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Rehydrated tube: 25°C or 4°C for up to 4 hours. For a longer period, store directly at –20°C during the shelf life stated in the kit label.	Immediate use at Room temperature.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control vial		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Rehydrated control: –20°C during the shelf life stated in the kit label.	Immediate use at Room temperature.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Rehydrated control: –20°C during the shelf life stated in the kit label.	Immediate use at Room temperature.
Rehydration Buffer		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature.
Negative Control vial		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature.
Water RNase/DNase free vial		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label.	Room temperature.
Extraction Control		Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: –20°C during the shelf life stated in the kit label.	Immediate use at Room temperature.

Table 1. Summary of the conditions for transport, storage and use of the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit and each component.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Instructions for use must be read carefully before using the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. Do not perform the PCR assay until the information about procedures, safety precautions and limitations described in the Instructions for use have been understood.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.

- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Once the protective aluminium seal has been removed from the strips or the tubes have been opened, the end user must use the strips or tube in the shortest time possible to protect the master mix from sunlight.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-JIR113L, VS-JIR113H, VS-JIR136, VS-JIR172, VS-JIR113LE, VS-JIR113HE, VS-JIR136E and VS-JIR172E). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-JIR102, VS-JIR136, VS-JIR172, VS-JIR102E, VS-JIR136E and VS-JIR172E (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- 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.
- Once the pouch of Positive Control, Quantitative Standard, Extraction Control or reaction mixture in tube format has been opened, rehydrate the vials immediately, use them in the PCR reaction or store them properly. It is not recommended to leave the vial open without resuspending, as this may cause deterioration of the reagent.
- Once the protective aluminium seal has been removed from the strips, use them immediately for the qPCR (rehydrate the wells, add the samples, and place the strips into the thermocycler). It is not recommended to leave the strips open without resuspending. Likewise, once the required wells are rehydrated, the addition of nucleic acid and performance of the qPCR must be carried out immediately.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.

- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration. Material Safety Data Sheet are not included with this device, nevertheless it could be consulted upon request to CerTest Biotec.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.
- Make sure that the configuration and conditions of the settings on the thermocycler is done following the instructions in the section 'PCR protocol' of Annexes 1, 2, 3 and 4 (DNA/RNA protocol, number of cycles, temperatures etc.).
- The certificate of analysis is not included with the device; however, it could be requested to CerTest Biotec in case of need.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open and Rotor-Gene format with internal control products Test Procedure, Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure, Annex 3 for Open and Rotor-Gene format with extraction control products Test Procedure and Annex 4 for Tube format with extraction control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit has been tested in respiratory samples (bronchoalveolar lavage fluid (BAL) samples, bronchoalveolar aspirates (BAS) and sputum). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage, and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, all specimens should be collected and labelled appropriately in clean containers. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and should be transported and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The clinical specimens should be transported at Room Temperature (RT) for up to 2 hours, or 4° C for up to 7 days, following the local and national regulations for the transport of pathogen

material. For long term transport (more than 7 days), we recommend shipping at -20°C or lower¹. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 4° C for up to 7 days, or frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines and/or microbiology laboratory policy manuals. As example, refer to García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

Please note: Specimen collection, transport, and storage conditions indicated above are suggested based on the recommendations for respiratory samples intended to be used for nucleic acid detection, as appear in the referenced SEIMC recommendations report for general collection and transport procedures in clinical microbiology. Nevertheless, we recommend following laboratory guidelines, and/or microbiology laboratory policy manuals for proper transport and preservation of samples.

8.2. DNA extraction

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

Due to VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit is also available with Extraction Control (references included in Annexes 3 and 4), if the Extraction Control (EC) is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, add 5µL of the reconstituted EC to the specimen and/or lysis buffer mixture. Close each tube and vortex for 10 seconds. If the Extraction Control is used only as a PCR inhibition control, 1µL of the reconstituted EC should be added per well/reaction.

Please note: Positive and Negative control must not be extracted. However, to monitor or control the extraction process and discard possible contaminations, a blank sample (not provided in the kit) could be extracted following the same procedure used for clinical samples. Blank sample should consist of the same matrix (real or simulated) as clinical samples, previously characterized as negative for all targets.

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

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

¹ García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

In case of using different DNA extraction kits than those mentioned above, their validation shall be performed by the end-user, following the manufacturer's instructions for use.

8.3. Standard curve preparation for quantitative assay

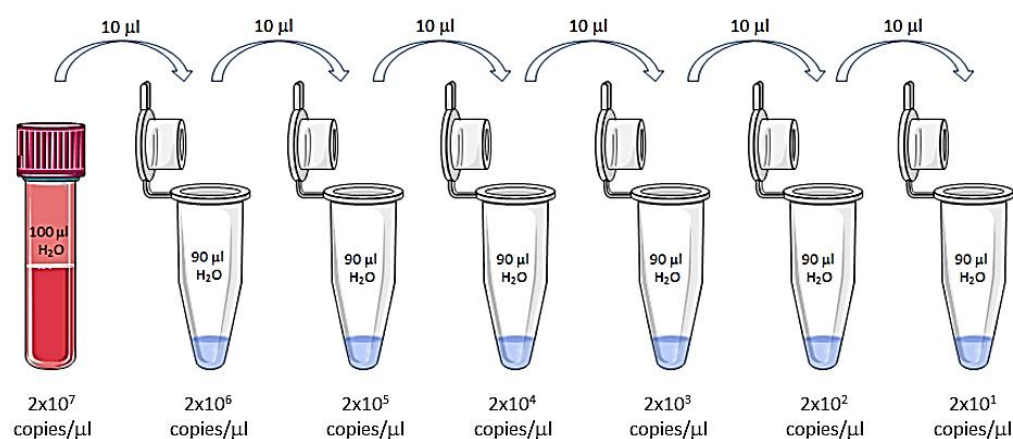
This kit can be used to quantify the DNA copy number of *Pneumocystis jirovecii*. To perform a quantitative assay, a standard curve must be prepared by serial dilution of *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (which contains approximately 2×10^7 copies/ μL *). Take *Pneumocystis jirovecii* Quantitative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

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

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

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

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



9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annex 1 and 2)

9.1.1 Qualitative assay

The result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Internal Control (IC) signal to verify the correct functioning of the

amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. The threshold must be established in each run. Please, if your equipment sets the threshold automatically, check and verify that it adjusts to the positive control or adjust it manually. For each channel, select the well corresponding to the positive control, and fix the threshold within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). Once the threshold has been established, the rest of the samples of the same run can be interpreted.

The threshold value of the different channels could be different due to the chemical nature of the different fluorophores. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

It is also recommended to include a blank, consisting of a confirmed negative sample (the same matrix as tested samples) for the targets detected in order to set the baseline of the assay.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Pneumocystis jirovecii* in the positive control well.

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

Controls	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM) ¹	Internal control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 2. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curve.

1. In cases where either or both control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid', and retesting is required.

2. The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in control wells (PC and NC).

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, **select only the channels where targets are detected**. Then, use the following table, read and analyze the results:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM)	Internal control (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA detected
>40 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected²
>40 or no signal	>35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing²

Table 3. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve.

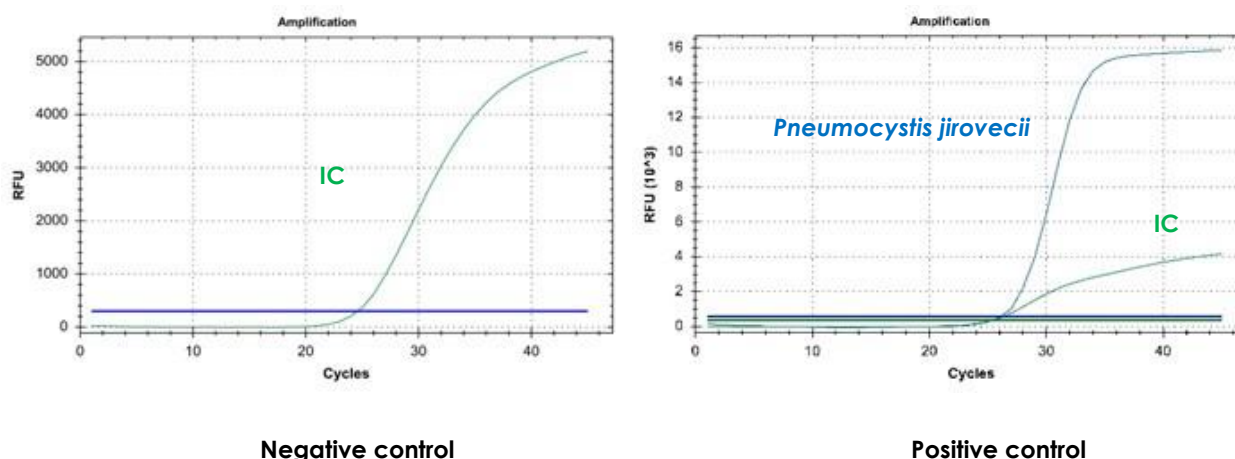
1 The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal ($C_t \leq 40$ or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. In case of one of the targets presents a high number of copies, the rest of targets remain negative, and the Internal Control does not show amplification signal, false negatives of other targets cannot be discarded. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10.

2 In the case of *Pneumocystis jirovecii* target gene negative, IC must show an amplification signal with $C_t \leq 35$. If there is an absence of signal or C_t value > 35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- a) repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- c) obtain a new specimen and retest.

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



9.1.2 Quantitative assay

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

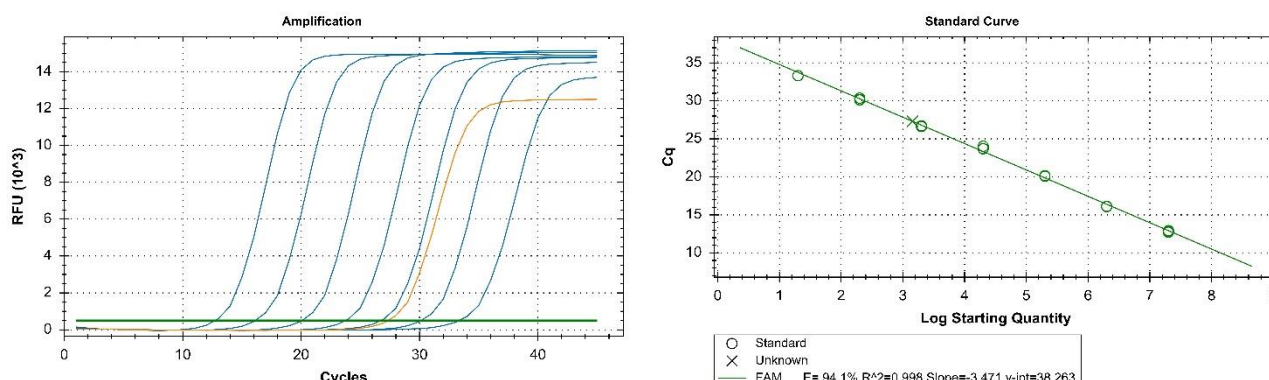
$$C_t = m \log (Q) + b$$

Where: C_t = Threshold Cycle; m = Slope; Q = Concentration; and b = Intercept.

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

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

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



The concentration of your “Positive sample” 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, consider the dilutions of the extraction procedure and PCR Set-up.

9.2. References with extraction control (references in Annex 3 and 4)

9.2.1 Qualitative assay

The result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Extraction Control (EC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer’s instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. The threshold must be established in each run. Please, if your equipment sets the threshold automatically, check and verify that it adjusts to the positive control or adjust it manually. For each channel, select the well corresponding to the positive control, and fix the threshold within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). Once the threshold has been established, the rest of the samples of the same run can be interpreted.

The threshold value of the different channels could be different due to the chemical nature of the different fluorophores. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

It is also recommended to include a blank, consisting of a confirmed negative sample (the same matrix as tested samples) for the targets detected in order to set the baseline of the assay.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Pneumocystis jirovecii* in the positive control well. For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM) ¹	Extraction Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 4. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curve.

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid', and retesting is required.

2. The Extraction Control (EC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in control wells (PC and NC). 1 µL of EC must be added to PC and NC prior to start qPCR (see section "PCR protocol" of Annexes 3 and 4).

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, **select only the channels where targets are detected**. Then, use the following table, read and analyze the results:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM)	Extraction Control (HEX)	Interpretation for patient's individual samples	
≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA detected
>40 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected²
>40 or no signal	>35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing²

Table 5. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve.

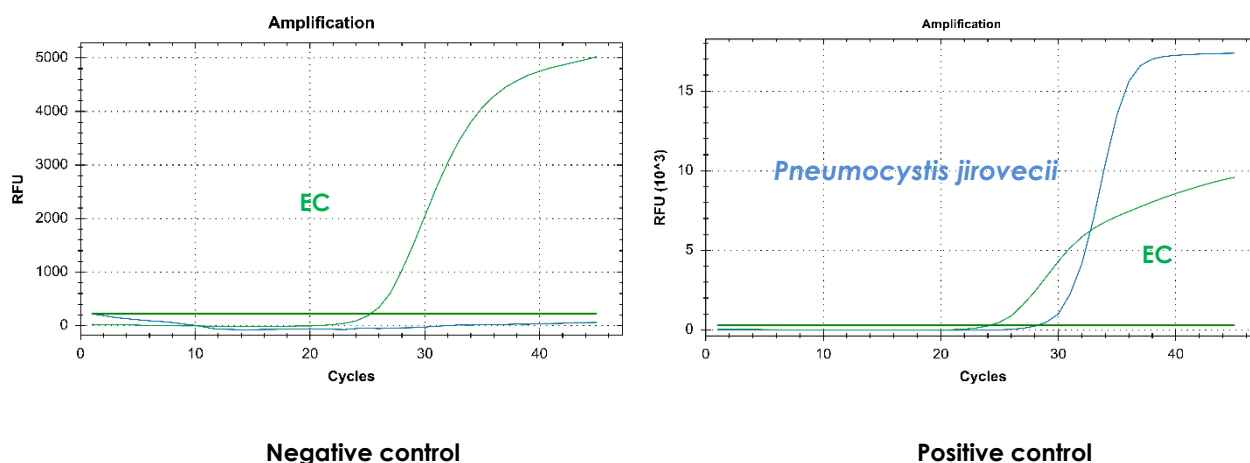
1 The Extraction Control (EC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. Differences can be observed in the values of Ct in the extraction control between the controls and the clinical samples, due to the extraction process. In case one of the targets presents a high number of copies, the rest of targets remain negative, and the Extraction Control does not show amplification signal, false negatives of other targets cannot be discarded. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10.

2 In the case of *Pneumocystis jirovecii* target gene negative, EC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

Figure 4. Correct run of negative and positive control run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



9.2.2 Quantitative assay

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

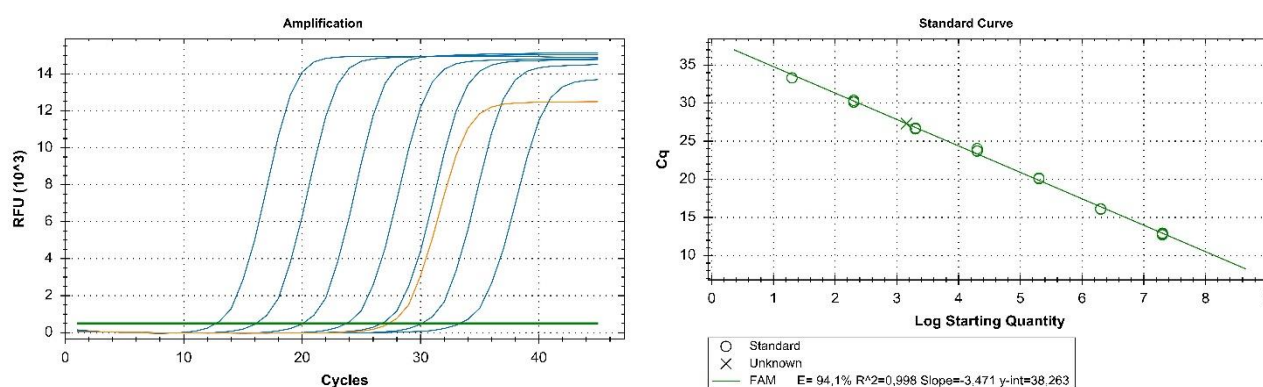
$$Ct = m \log (Q) + b$$

Where: Ct = Threshold Cycle; m = Slope; Q = Concentration; and b = Intercept.

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

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

Figure 5. Standard curve from the dilution series (blue) and quantification of a positive sample of unknown concentration (orange) run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



The concentration of your "Positive sample" 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, consider the dilutions of the extraction procedure and PCR Set-up.

10. Limitations of the test

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

- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from bronchoalveolar lavage fluid (BAL) samples, bronchoalveolar aspirates (BAS) and sputum.
- 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. Please contact to viasuresupport@certest.es for any queries.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Pneumocystis jirovecii*, either by the high number of DNA template copies which contains each *Pneumocystis jirovecii* Positive Control vial or *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard, samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *Pneumocystis jirovecii* Positive Control and/or *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard, which contains high copies of the template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory areas.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *Pneumocystis jirovecii* varieties.
 - A fungal load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable fungi and does not imply that these fungi are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targeted fungal sequences.
- Negative results do not preclude *Pneumocystis jirovecii* infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak microbial levels during infections caused by *Pneumocystis jirovecii* have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the microorganism(s).
- If diagnostic tests for other respiratory infections are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *Pneumocystis jirovecii* is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment (even being the same model), extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

- Positive control and Negative control must not be extracted, but a blank sample is recommended to be included throughout the extraction and qPCR workflow to discard possible contaminations. Potential false positive results might remain undetected if blank sample is omitted.

11. Quality control

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) or the Extraction control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

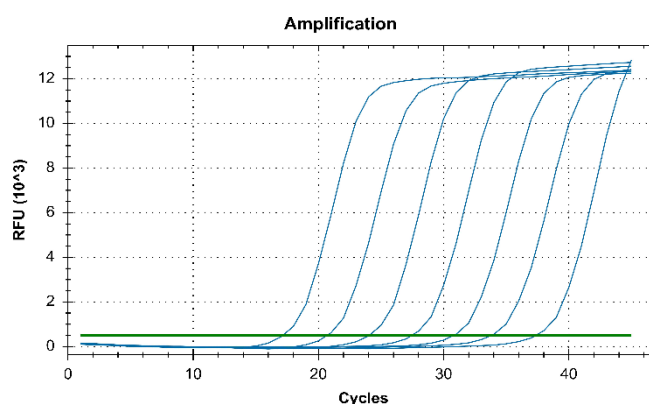
12. Analytical performance characteristics

12.1. Analytical linearity and Analytical sensitivity (Limit of Detection (LoD))

The linearity of the assay was determined by testing a series of ten-fold dilutions containing a known concentration (ranging from 10^7 to 10^1 copies per reaction) of specific and synthetic DNA belonging to *Pneumocystis jirovecii*, on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Example of the amplification plot resulting from an assay run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) is included below:

Figure 6. Dilution series of *Pneumocystis jirovecii* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).



Using the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), VIASURE *Pneumocystis jirovecii*, Real Time PCR Detection Kit showed a detection limit of 10 DNA copies per reaction for *Pneumocystis jirovecii*, with a positive rate of $\geq 90\%$.

12.2. Accuracy

12.2.1. Trueness (Veracity)

The veracity of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit was evaluated by testing the reference material listed below. Reference strains were analysed with the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

1. EQA programmes:

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

Table 6. Reference material from EQA programmes, analysed with the CFX96™ / CFX96 Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and with the AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

12.2.2. Precision

To determine the precision of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, intra-assay (repeatability), inter-assay (reproducibility), inter-batch (intermediate precision) and inter-thermocycler (site-to-site) assays were performed. The panel of samples were extracted with Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Intra-assay. Repeatability

The repeatability was tested by analysing replicates of all samples in the same run using VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, run on AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). The following tables show the results obtained in this assay.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Sample	Target	Viasure 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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Internal Control	HEX	24.94	0.11	0.44

Table 7. Intra-assay repeatability results of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle, ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-assay. Reproducibility

The reproducibility was tested by analysing the different samples on three different days by three different operators with the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, run on AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). A summary of results is shown in the tables below.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Sample	Target	Viasure 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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Internal Control	HEX	25.23	0.18	0.70

Table 8. Inter-assay reproducibility results of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-batch. Intermediate precision

The inter-batch values were determined with three replicates of the different samples by using three batches of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, run on AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). The results are described in the following tables.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Sample	Target	Viasure 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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Internal Control	HEX	25.19	0.29	1.15

Table 9. Inter-batch intermediate precision results of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle. ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

Inter-thermocycler. Site-to-site

The inter-thermocycler values were determined with three replicates of the same samples used for intra-assay, inter-assay and inter-batch, using the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. The DNA extracted from samples and positive and negative controls were tested all together in the same run, on 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 results are described in the following tables.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Sample	Target	Viasure 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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Internal Control	HEX	23.22	2.43	10.47

Table 10. Inter-thermocycler site-to-site results of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = threshold cycle, ($\bar{x}$) = arithmetic mean Ct value, (σ) = standard deviation, (CV %) = coefficient of variation, Neg = negative, n.a.= not applicable.

12.3. Analytical specificity and reactivity

The analytical specificity and reactivity were evaluated for the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit *in silico* and using different starting material such as material from the EQAs programs.

12.3.1. Analytical Specificity

12.3.1.1. Cross-reactivity and exclusivity assay

Cross-reactivity: *in silico* analysis

The Analytical Specificity (Cross-reactivity) was assessed by using publicly available nucleotide sequence databases and search and/or alignment tools as BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Mafft Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) and Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The bioinformatics analyses showed that the selected primers and probes should not cause false positives in detecting *Pneumocystis jirovecii* when other organisms are present.

Cross-reactivity: wet testing

The Analytical Specificity of the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit assay was confirmed by testing a panel of different microorganisms associated to the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except for the targeted microorganisms.

Cross-reactivity testing					
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	-	Metapneumovirus humano A1	-
Adenovirus Type 5	-	Enterovirus Coxsackievirus A24	-	Metapneumovirus humano A2	-
Adenovirus Type 8	-	Enterovirus Coxsackievirus B3	-	Metapneumovirus humano 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	-
Bocavirus	-	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.	-	Rhinovirus type C	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A (H1N1) pdm09). Strain A/Michigan/45/2015 (vaccine strain)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A (H1N1) pdm09- virus. Strain A/California/7/2009/ (vaccine strain).	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype A	-	Influenza A, B and H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) ; A/Victoria/210/2009 (H3N2) (Cepa similar a 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 (Cepa similar a 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	-	RSV A	-
Coronavirus MERS	-	<i>Legionella bozemanii</i> Serovar 1	-	RSV B	-
Coronavirus NL63	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-		

Table 11. Reference pathogenic microorganisms used in this study performed at CerTest facility.

Interferences and inhibitors of PCR

No endogenous or exogenous substances interfere with the VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

12.3.2. Analytical reactivity

Analytical Reactivity *in silico* assay

The Analytical Reactivity (Inclusivity) was assessed by using publicly available nucleotide sequence databases and search and/or alignment tools as BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Mafft Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) and Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The

bioinformatics analyses showed that the selected primers and probes matched with nucleic acid sequences of *Pneumocystis jirovecii*.

Analytical reactivity wet testing

The reactivity of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against the DNA from following strains from QCMD EQA programme, with a positive result:

- *Pneumocystis jirovecii*
- *Pneumocystis jirovecii* Type 1A
- *Pneumocystis jirovecii* g885652
- *Pneumocystis jirovecii* j888023

13. Clinical performance characteristics

The clinical performance of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit was tested using respiratory clinical samples from patients with suspicion of *Pneumocystis jirovecii* infection. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, different multicenter evaluations were conducted through collaboration with national and international entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS, Zaragoza, Spain)	Sputum Bronchoalveolar lavage (BAL)	automated nucleic acid extraction system (EZ1, Qiagen) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
2	Medical School of the Universidad de la República - EdelaR (Uruguay)	Bronchoalveolar lavage (BAL)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
3	Certest Biotec S.L. and Biobanco of the Sistema de Salud de Aragón (Zaragoza, Spain)	Sputum Bronchoalveolar lavage (BAL) Bronchoalveolar aspirates (BAS)	MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>

Table 12. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV and NPV values for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	FTD <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Fast-Track Diagnostics)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	11	3	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.29-1)	1 (0.74-1)	1 (0.43-1)
2	Routine analysis + RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR Kit (Altona Diagnostics)	<i>P. jirovecii</i> infection	11	33	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.89-1)	1 (0.67-1)	1 (0.87-1)
		<i>P. jirovecii</i> colonization	1	43	0	0	1 (0.02-1)	1 (0.91-1)	1 (0.05-1)	1 (0.89-1)
3	RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR (Altona Diagnostics)	<i>P. jirovecii</i> (BAS)	8	307	0	0	1 (0.63-1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.63-1)	1 (0.98 – 1)
		<i>P. jirovecii</i> (Sputum)	2	233	0	0	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)
		<i>P. jirovecii</i> (Total)	10	702	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.69-1)	1 (0.99 – 1)

Table 13. True positive (TP) and true negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV) and Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect *Pneumocystis jirovecii* DNA using VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

ANNEX 1

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, low profile	VS-JIR102L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, high profile	VS-JIR102H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-JIR106L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-JIR106H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-JIR112L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-JIR112H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-JIR113L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-JIR113H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 4 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR102
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR136
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR172

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

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

Target	Channel	Gene
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	<i>mtLSU rRNA</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A1 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.ceratest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A1.3, A1.4 and A1.5. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. Table A1.5 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.ceratest.es).

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 8-well strips	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	2/6/12 x 8-well strip
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	-	Transparent	2/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR102L, VS-JIR102H, VS-JIR106L, VS-JIR106H, VS-JIR112L and VS-JIR112H.

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

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 96-well plate	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	1 plate
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	-	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-JIR113L and VS-JIR113H.

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

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 4-well strips	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	Transparent	4/9/18 x 4-well strip
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL

4-cap strip	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	-	Transparent	4/9/18 X 4-cap strip
-------------	---	---	-------------	----------------------

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR101, VS-JIR136 and VS-JIR172. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

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

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control and quantitative standard

Pneumocystis jirovecii Positive Control and *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard contains high copies of the template; the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red vial) by adding 400 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A1.3.2 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay.

Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant. Peel off protective aluminium seal from strips you need for the assay.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red vial), Negative Control (violet vial) for qualitative test, or standard curve dilutions for quantitative assay in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es).

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

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

Table A1 6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Pneumocystis jirovecii*) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used, select in the thermocycler only the proper channels where targets are detected (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-JIR196T

Table A2. 1.References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	<i>mtLSU rRNA</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A2. 2.Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website www.ceratest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Reaction-Mix tube	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	4 vials
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR196T.

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

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control and quantitative standard

Pneumocystis jirovecii Positive Control and *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard contains high copies of the template; the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red vial) by adding 400 μL

of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C or 4°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red vial), Negative Control (violet vial) for qualitative test, or standard curve dilutions for quantitative assay in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tubes in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

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

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Pneumocystis jirovecii*) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 3

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, low profile	VS-JIR102LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, high profile	VS-JIR102HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-JIR106LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-JIR106HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-JIR112LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-JIR112HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-JIR113LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-JIR113HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 4 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR102E
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR136E
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR172E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	<i>mtLSU rRNA</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A3. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A3.2 Reagents provided

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A3.3, A3.4 and A3.5. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A3.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible instruments. Table A3.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible instruments. Table A3.5 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 8-well strips	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	2/6/12 x 8-well strip
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	2x10 ⁴ copies/μL*	Green	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	-	Transparent	2/6/12 x 8-cap strip

Table A3. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR102LE, VS-JIR102HE, VS-JIR106LE, VS-JIR106HE, VS-JIR112LE and VS-JIR112HE.

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

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 96-well plate	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	1 plate
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	2x10 ⁴ copies/μL*	Green	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	-	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A3. 4. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-JIR113LE and VS-JIR113HE.

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

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 4-well strips	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	Transparent	4/9/18 x 4-well strip
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	2x10 ⁴ copies/μL*	Green	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL
4-cap strip	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	-	Transparent	4/9/18 x 4-cap strip

Table A3 5. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR102E, VS-JIR136E and VS-JIR172E. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

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

A3.3 Test procedure

A3.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) by adding 500 μL of Water RNAse/DNAse free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNAse/DNAse free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used to reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control and/or *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control and quantitative standard

Pneumocystis jirovecii Positive Control and *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard contain high copies of the template; the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red vial) by adding 400 μL of the supplied Water RNAse/DNAse free (white vial) and the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (red vial) by adding 100 μL of the supplied Water RNAse/DNAse free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A3.3.3 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay.

Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant. Peel off protective aluminium seal from plates you need for the assay.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (aluminium pouch, red vial) in the reserved wells for positive control, or 5 µL of standard curve dilutions for quantitative assay in different wells.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

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

Load the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

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

Table A3. 6. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Pneumocystis jirovecii*) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-JIR196TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	<i>mtLSU rRNA</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A4. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.cerest.es.

A4.2 Reagents provided

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A4.3.

Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Reaction-Mix tube	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL*	White (Opaque)	4 vials
	Nucleotide triphosphate (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers and Probes	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzymes	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Saline Solution Mixture	±13 mM	Blue	1 vial x 1.8 mL
	Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	1.9x10 ⁴ copies/μL*	Red	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copies/μL*	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	2x10 ⁴ copies/μL*	Green	1 vial
Negative control	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	1 g/mL	White	1 vial x 1 mL

Table A4. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-JIR196TE.

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

A4.3 Test procedure

A4.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used to reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control and/or *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control and quantitative standard

Pneumocystis jirovecii Positive Control and *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard contain high copies of the template; the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red vial) by adding 400 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and the lyophilized *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Pneumocystis jirovecii* Diseases Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C or 4°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A4.3.4 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix (white vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control or 5 µL of standard curve dilutions for quantitative assay in different wells.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

Close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips or tubes in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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

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

Table A4. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Pneumocystis jirovecii*) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Finalidad prevista

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

2. Introducción y explicación

La neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP), también conocida como neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, es una infección fúngica que afecta con mayor frecuencia a personas inmunodeprimidas y, en algunos casos, puede ser gravemente mortal.

Los signos y síntomas clásicos de la infección por *Pneumocystis* incluyen disnea, tos seca, respiración rápida, fiebre, escalofríos, sudores, fatiga y cianosis, síntomas que pueden confundirse fácilmente con los de la tuberculosis (TB). La infección diseminada de *Pneumocystis* es muy rara. La inmunosupresión, el uso de corticosteroides a corto o largo plazo y la presencia de enfermedad pulmonar crónica son los principales factores de riesgo para la infección por especies de *Pneumocystis*. (Harris, J.R., et al., 2010).

Con respecto a la transmisión, se cree que *Pneumocystis jirovecii* se transmite de persona a persona a través de una vía aérea. La colonización pulmonar asintomática puede ocurrir en personas con sistemas inmunitarios normales y, sin saberlo, pueden convertirse en reservorios (portadores asintomáticos) para la propagación de *Pneumocystis* a personas inmunocomprometidas (Truong J, Ashurst JV., 2023).

Pneumocystis jirovecii es extremadamente difícil de cultivar y tradicionalmente se ha diagnosticado con base en los síntomas clínicos y la visualización radiográfica con la siguiente confirmación mediante visualización del organismo teñido. Así, existe un creciente interés en métodos alternativos, como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la citometría de flujo, los ensayos de anticuerpos, los ensayos de antígenos y biomarcadores y los métodos de diagnóstico basados en PCR, que se presentan como una buena alternativa debido a la alta tasas de especificidad y sensibilidad, y la reducción de los tiempos de diagnóstico.

Con la incorporación de pruebas diagnósticas más sensibles, *Pneumocystis jirovecii* se identifica cada vez más en personas asintomáticas o sin los síntomas asociados clásicamente con la PCP. Este fenómeno se ha denominado colonización y, aunque afecta entre el 9 y el 69 % de los pacientes inmunocomprometidos, se desconoce su significado clínico. Existe una alta preocupación de que la colonización pueda aumentar el riesgo de progresión a PCP, y los fenotipos que progresan no estén bien definidos. La progresión de una colonización de *Pneumocystis jirovecii* a PCP en pacientes inmunocomprometidos es ampliamente probable. La identificación de los pacientes con mayor riesgo de progresión y el inicio de profilaxis o tratamiento puede prevenir una morbilidad y mortalidad significativas (Marjorie Bateman, et al., 2020).

3. Procedimiento

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa y cuantitativa de DNA procedente *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias (fluido de lavados broncoalveolares, aspirados broncoalveolares, y esputos). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Pneumocystis jirovecii* se realiza mediante la amplificación de una región conservada del ARN ribosomal de la subunidad grande mitocondrial (*mtLSU rRNA*), de *Pneumocystis jirovecii*, usando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Dicha fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real. Además, la cuantificación de DNA específico de *Pneumocystis jirovecii* puede lograrse mediante la generación de una curva estándar utilizando el estándar cuantitativo de *Pneumocystis jirovecii* suministrado con el kit.

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contiene todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores / sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en un formato estabilizado, así como un **control interno o de extracción** con el que verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

El control interno (CI) verifica si la reacción de amplificación funciona correctamente. Si la reacción PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor o porque el pocillo está incorrectamente rehidratado, este control puede resultar negativo.

El control de extracción (CE) controla la eficiencia del método de extracción y verifica la reacción PCR. Se suministra en un vial adicional y debe añadirse a las muestras antes del proceso de extracción.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open y rotor-gene format" con productos con control interno, el anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el anexo 3 para "open y rotor-gene format" con productos con control de extracción y el anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

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

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 µL, 20-200 µL).

- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Bloque de carga (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^\circ\text{C}$.
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Blanco de muestra (Ver sección 8.2 Extracción DNA).

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit se ha testado con los siguientes equipos: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), CFX96 Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology), DTlite real-time PCR instrument (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics), SmartCycler® (Cepheid), VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L) y Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics).

Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits".

Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite real-time PCR instrument (DNA-Technology): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

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

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.
- Almacenar el control positivo y el Quantitative Standard a -20°C tras su re-suspensión hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo y del Quantitative Standard tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Para el Quantitative Standard los ciclos de congelación y descongelación sólo es aplicable para el vial reconstituido o sus alícuotas. Durante el uso correcto del producto, las diluciones de la curva estándar deben desecharse después de cada uso.

- Para kits en formato tubo: Una vez el vial *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix ha sido reconstituido, puede mantenerse a 25°C o 4°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos). Una vez abierto o rehidratado el tubo, debe guardarse para mantener el vial alejado de la luz.
- Para kits de formato abierto (tiras): Para un uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar pocillos adicionales que no necesiten ser utilizados. Si no se utilizan todos los pocillos provistos en una tira de 8 pocillos, la cantidad requerida de pocillos de reacción se puede cortar fácilmente de dichas tiras. Si no se utilizan todos los pocillos, se recomienda que los pocillos no utilizados se almacenen en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro para evitar el contacto con la luz hasta su uso. La bolsa abierta con pocillos no rehidratados a 2-40°C es estable hasta 24 meses.
- Para tiras: Una vez que los pocillos a emplear se hayan rehidratado, tanto la adición del ácido nucleico como la realización de la qPCR debe realizarse inmediatamente.
- Una vez el vial de Control de Extracción ha sido reconstituido, se recomienda emplearse inmediatamente o almacenarlo a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
Kit completo VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit.	2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta.	Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	* Ver condiciones "en uso" de cada componente.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> well-strip (Ver anexos 1 y 3).		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Pocillos no rehidratados en un sobre abierto con el gel de sílice: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> reaction mix tube (Ver anexos 2 y 4).		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Tubo rehidratado: 25°C o 4°C hasta 4 horas. Para un periodo más largo, almacenar directamente a -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
Vial <i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control Rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control Rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
Rehydration Buffer		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Vial Negative Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Vial Water RNase/DNase free		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Extraction Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.

Tabla 1. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit y cada uno de sus componentes.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- Las instrucciones de uso se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. No llevar a cabo el ensayo PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en las instrucciones de uso.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Una vez retirado el aluminio protector de las tiras o abiertos los tubos, el usuario final deberá utilizar las tiras o el tubo en el menor tiempo posible para proteger la mezcla de reacción de la luz solar.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-JIR113L, VS-JIR113H, VS-JIR136, VS-JIR172, VS-JIR113LE, VS-JIR113HE, VS-JIR136E y VS-JIR172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- A tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior a la suministrada en una tira, antes de retirar el sello protector, corte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para las referencias VS-JIR102, VS-JIR136, VS-JIR172, VS-JIR102E, VS-JIR136E y VS-JIR172E (compatible con los instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®), usar el bloque de carga para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar a colocar las tapas correctamente y evitar la contaminación cruzada.
- 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.
- Una vez abierto el sobre del Control Positivo, del Quantitative Standard, del Control de Extracción o de la mezcla de reacción en formato de tubo, rehidratar los viales inmediatamente, utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos correctamente. No se recomienda dejar el vial abierto sin resuspender, ya que esto puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- Una vez retirado el sello protector de aluminio de las tiras, utilícelas inmediatamente para el ensayo qPCR (rehidrate los pocillos, agregue las muestras y coloque las tiras en el termociclador). No se recomienda dejar

las tiras abiertas sin resuspender. Asimismo, una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe añadir el ácido nucleico en cada pocillo y llevarse a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.

- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración. La hoja de datos de seguridad no se incluye con este producto, sin embargo, puede ser consultada bajo petición a CerTest Biotec.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Asegúrese de que la configuración y las condiciones de los ajustes en el termociclador se realizan siguiendo las instrucciones de la sección "Protocolo PCR" de los Anexos 1, 2, 3 y 4 (protocolo DNA/RNA, número de ciclos, temperaturas, etc.).
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede solicitar a CerTest Biotec en caso de necesidad.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para "open y rotor-gene format" con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para "open y rotor-gene format" con productos con control de extracción y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection kit ha sido validado en muestras respiratorias (fluido de lavados broncoalveolares, aspirados broncoalveolares, y esputos). Otros tipos de muestras diferentes deben ser validadas por el usuario.

La recogida, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, todos los especímenes deben recogerse y etiquetarse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesados a la mayor brevedad para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras clínicas pueden ser transportados a temperatura ambiente hasta 2 horas, o a 4° C hasta 7 días, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 7 días, se recomienda realizar el envío a -20°C o menos¹. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse a 4° C hasta 7 días, o congeladas a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recogerse, transportarse y almacenarse de acuerdo con las directrices apropiadas del laboratorio y/o los manuales de políticas del laboratorio de microbiología. Como ejemplo, consulte a García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

Nota: Las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras respiratorias destinadas a la detección de ácidos nucleicos, tal y como aparecen en el informe referenciado de recomendaciones de la SEIMC para procedimientos generales de recogida y transporte en microbiología clínica. No obstante, recomendamos seguir las directrices del laboratorio y/o los manuales de política del laboratorio de microbiología para el transporte y la conservación adecuados de las muestras.

8.2. Extracción de DNA

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

¹ García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

Debido a que VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit también está disponible con control de extracción (las referencias se incluyen en los Anexos 3 y 4), si el control de extracción (CE) se usa para monitorear el aislamiento de ácido nucleico y como control de inhibición de la PCR, agregue 5µL del CE reconstituido a la muestra y/o mezcla de tampón de lisis. Cierre cada tubo y agite en el vórtex durante 10 segundos. Si el control de extracción se usa solo como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1µL del CE reconstituido por pocillo/reacción.

Tener en cuenta: El control positivo y negativo no deben ser extraídos. Sin embargo, para monitorizar o controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la muestra clínica. El blanco de muestra debería consistir en la misma matriz (real o simulada) que las muestras clínicas, previamente caracterizado como negativo para todas las dianas.

Para la extracción de DNA de muestras clínicas, puede utilizar su sistema manual o automático de rutina optimizada, o cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones del fabricante. Se han validado los siguientes kits de extracción:

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

En caso de emplear kits de extracción de DNA distintos a los arriba mencionados, la validación de éstos debe ser realizada por parte del usuario final, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

8.3. Preparación de una curva estándar para ensayos cuantitativos

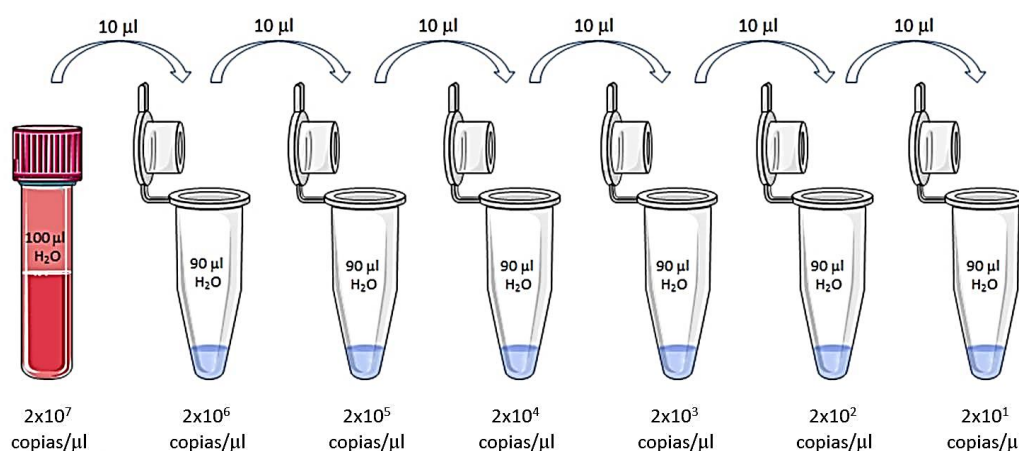
Este kit puede utilizarse para cuantificar el número de copias de DNA de *Pneumocystis jirovecii*. Para realizar ensayos cuantitativos, se recomienda preparar una curva estándar mediante diluciones seriadas a partir de *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard (el cual contiene aproximadamente 2×10^7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

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

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

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

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



9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

9.1.1. Ensayo cualitativo

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de control interno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo 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). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor de umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

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

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo de control negativo y la presencia de señal en el pocillo de control positivo para *Pneumocystis jirovecii*.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los controles
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 o sin señal	≤40	Valid

Tabla 2. Rendimiento esperado de los controles. Ct no señal = sin curva de amplificación.

1. En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2. El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM)	Control Interno (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>Pneumocystis jirovecii</i> Detectado
>40 o sin señal	≤35 ²	Válido	Diana no Detectada²
>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	No válido	Test Fallido – Repita el Test²

Tabla 3. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación.

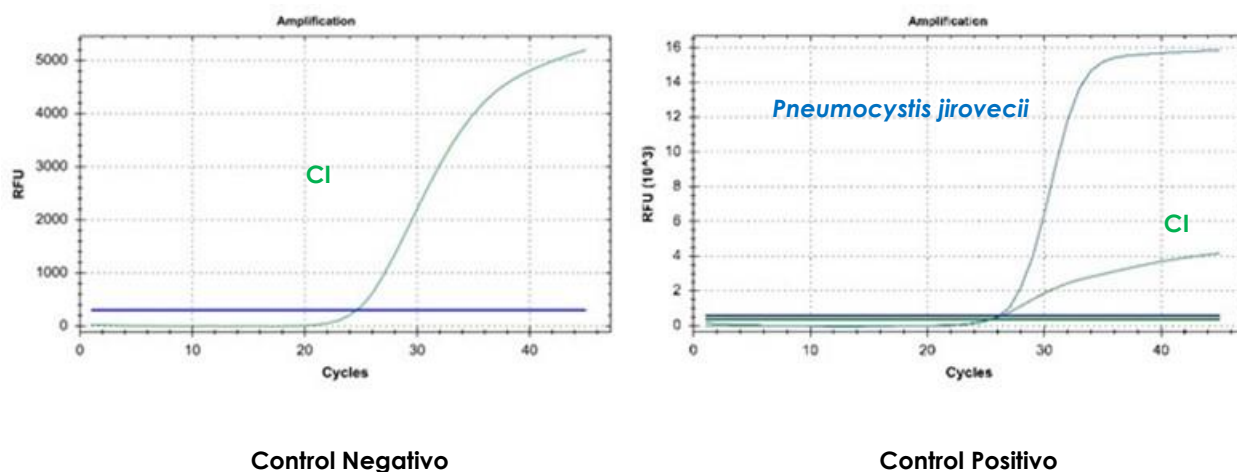
1 El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En caso de que una de las dianas presente un número elevado de copias, el resto de dianas permanezcan negativas, y el Control Interno no muestre señal de amplificación, no se pueden descartar falsos negativos de otras dianas. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10.

2 En el caso de que los genes diana de *Pneumocystis jirovecii* target resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 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.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

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



9.1.2. Ensayo cuantitativo

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

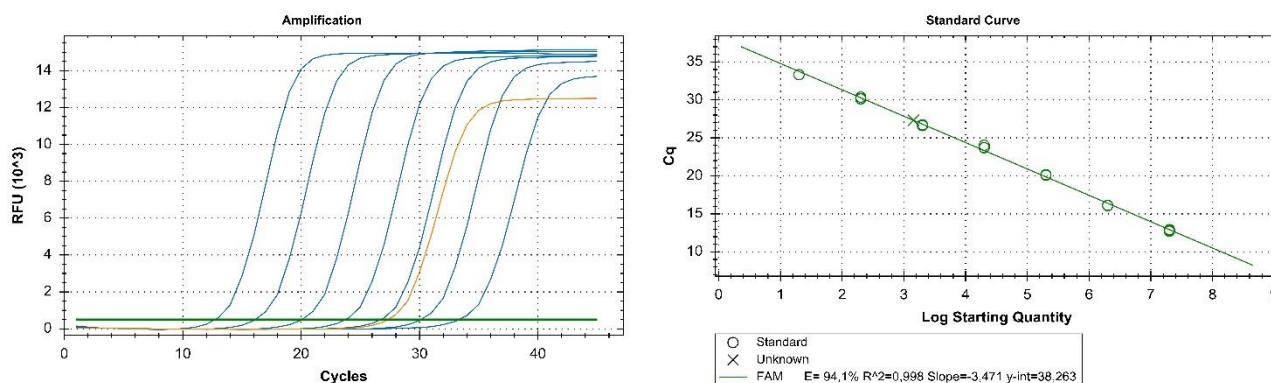
$$Ct = m \log (Q) + b$$

Donde Ct = ciclo umbral; m = pendiente; Q = concentración; y b = intersección.

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

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

Figura 3. Curva estándar a partir de las diluciones seriadas (azul) y cuantificación de una muestra positiva de concentración desconocida (naranja) generada en un CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



La concentración de su "Muestra positiva" se indica en copias/ μL , y hace referencia a la concentración del DNA eluido, 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.

9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

9.2.1. Ensayo cualitativo

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal del control de extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo 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). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor de umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

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

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo de control negativo y la presencia de señal en el pocillo de control positivo para *Pneumocystis jirovecii*.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	Interpretación de los controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	≤40	Válido

Tabla 4. Rendimiento esperado de los controles. Ct no señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN. Se debe añadir 1 µL de CE al CP y CN antes de comenzar la qPCR (ver sección "Protocolo PCR" de los Anexos 3 y 4).

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

<i>Pneumocystis jirovecii</i> (FAM)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40 o sin señal ¹	Válido	DNA de <i>Pneumocystis jirovecii</i> Detectado
>40 o sin señal	≤35 ²	Válido	Diana no Detectada ²
>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	No válido	Test Fallido – Repita el Test ²

Tabla 5. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación.

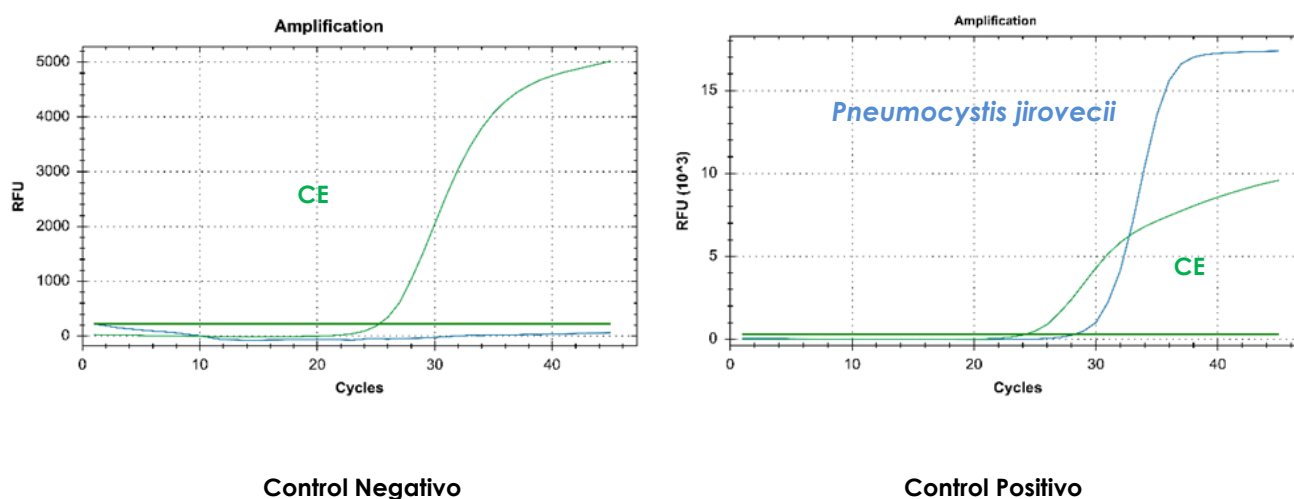
1 El Control de Extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct de los controles de extracción entre los controles y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción. En caso de que una de las dianas presente un número elevado de copias, el resto de dianas permanezcan negativas, y el Control de Extracción no muestre señal de amplificación, no se pueden descartar falsos negativos de otras dianas. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10.

2 En el caso de que los genes diana de *Pneumocystis jirovecii* resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control de extracción, el resultado se considera "invalido" 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.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 4. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



9.2.1. Ensayo cuantitativo

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

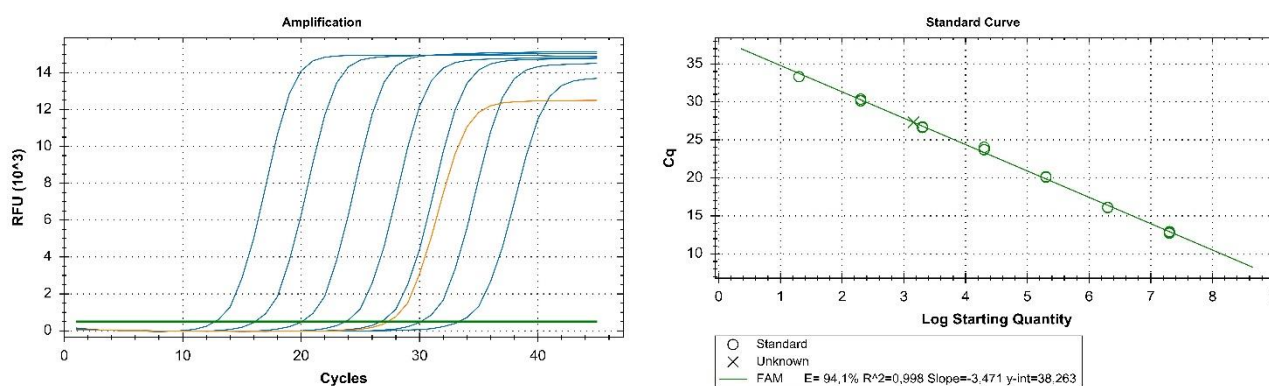
$$Ct = m \log (Q) + b$$

Donde Ct = ciclo umbral; m = pendiente; Q = concentración; y b = intersección.

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

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

Figura 5. Curva estándar a partir de las diluciones seriadas (azul) y cuantificación de una muestra positiva de concentración desconocida (naranja) generada en un CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



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

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo se ha validado con DNA extraído de muestras de fluido de lavados broncoalveolares, de aspirados broncoalveolares, y esputos.
- 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. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada por *Pneumocystis jirovecii*, ya sea por el gran número de copias de molde DNA que contiene cada vial *Pneumocystis jirovecii* Positive Control o *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard, muestras que

contienen altas concentraciones de DNA molde diana, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

- Existe la posibilidad de obtener falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción, *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y /o *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA fúngico durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de especies nuevas o desconocidas de *Pneumocystis jirovecii*.
 - Una carga fúngica en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, de terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos, o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección, o durante el tratamiento de la misma.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables y no implica que dichos microorganismos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana.
- Resultados negativos no excluyen padecer infección por *Pneumocystis jirovecii*, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimas y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga microbiana durante las infecciones causadas por *Pneumocystis jirovecii*. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el/los microorganismos.
- Si las pruebas de diagnóstico de otras enfermedades respiratorias son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *Pneumocystis jirovecii*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
- El Control Positivo y el Control Negativo no deben extraerse, pero se recomienda incluir un blanco de muestra durante el proceso de extracción y qPCR para descartar posibles contaminaciones. Podrían quedarse sin detectar resultados falsos positivos probables si se omite el blanco de muestra.

11. Control de calidad

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

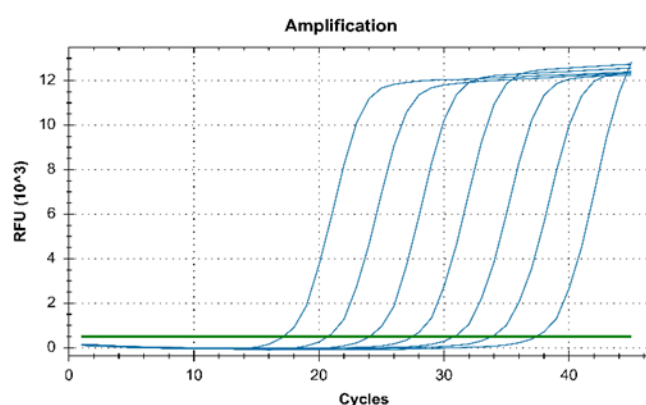
12. Características del funcionamiento analítico

12.1. Linealidad analítica y Sensibilidad analítica (Límite de Detección (LoD))

La linealidad del ensayo se determinó analizando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (en el rango entre 10^7 a 10^1 copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente a *Pneumocystis jirovecii*, en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

A continuación, se incluye un ejemplo de la gráfica de amplificación resultante de un ensayo realizado en el CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar de *Pneumocystis jirovecii* (10^7 - 10^1 copias/rxn) en CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)



Utilizando el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit mostró un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para *Pneumocystis jirovecii*, con una tasa de positivos de $\geq 90\%$.

12.2. Exactitud

12.2.1. Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit fue evaluada frente al material de referencia listado a continuación. 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).

1. Programas EQA:

Procedencia	Nombre del patógeno	Variedad
INSTAND EQA programme "Fungal Genome Detection - Pneumocystis jirovecii" panel (November	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-

2016, June 2017, November 2017, June 2018 and May 2020) QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2016, 2017, 2018, 2019, 2020 and 2022)		
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2016, 2017, 2018, 2019 and 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Type A1
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2017, 2018, 2019 and 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	g885652
QCMD <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia (PCP) DNA EQA Programme (2017, 2018, 2019 and 2020)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	j888023

Tabla 7. Cepas de referencia de programas EQA, analizadas con CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

12.2.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection kit, se realizaron ensayos intra-ensayo (repetibilidad), inter-ensayo (reproducibilidad), inter-lote (precisión intermedia) y ensayos inter-termociclador (entre laboratorios). El panel de muestras se extrajo con Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Intra-ensayo. Repetibilidad

La repetibilidad se probó analizando réplicas de todas las muestras en la misma carrera utilizando VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, empleando el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	24.63	0.08	0.31
Low Positivo	<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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	24.94	0.11	0.44

Tabla 8. Resultados de repetibilidad Intra-ensayo para VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-ensayo. Reproducibilidad

La reproducibilidad se probó analizando las diferentes muestras en tres días diferentes por tres operadores diferentes con el VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, empleando el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Un resumen de los resultados se muestra en las siguientes tablas.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.32	0.56	1.75
Low Positivo	<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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	25.23	0.18	0.70

Tabla 9. Resultados de reproducibilidad Inter-ensayo para VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-lote. Precisión intermedia

Los valores de inter-lote se determinaron analizando tres réplicas de diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit en AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Los resultados se describen a continuación en las siguientes tablas.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.62	0.31	0.96
Low Positivo	<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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	25.19	0.29	1.15

Tabla 10. Resultados de precisión intermedia Inter-lote para VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-termociclador. Entre laboratorios

Los valores inter-termociclador fueron determinados con tres réplicas de la misma muestra utilizadas para los ensayos intra-ensayo, inter-ensayo e inter-lote, utilizando VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. El DNA extraído de las muestras y el control positivo y 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) and DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology). Los resultados se describen en las tablas siguientes.

VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit					
Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Positivo	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	32.78	1.33	4.07
Low Positivo	<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	n.a.	n.a.
	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	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	23.22	2.43	10.47

Tabla 11. Resultados de ensayo Inter-termociclador para VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral. ($\bar{x}$) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

12.3. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit *in silico*, y empleando diferentes materiales de partida como material procedente de programas EQA.

12.3.1. Especificidad analítica

12.3.1.1. Reactividad cruzada y ensayo de exclusividad

Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La especificidad analítica (reactividad cruzada) se evaluó utilizando bases de datos de secuencias de nucleótidos disponibles públicamente y herramientas de búsqueda y/o alineación como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Mafft Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) y Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los análisis bioinformáticos mostraron que los primers y sondas seleccionados no deberían causar falsos positivos en la detección de *Pneumocystis jirovecii* cuando hay otros organismos presentes.

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La especificidad analítica de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel de diferentes microorganismos asociados a los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Prueba de reactividad cruzada					
Adenovirus Type 1	-	Coronavirus 0C43	-	<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	-	Metapneumovirus humano A1	-
Adenovirus Type 5	-	Enterovirus Coxsackievirus A24	-	Metapneumovirus humano A2	-
Adenovirus Type 8	-	Enterovirus Coxsackievirus B3	-	Metapneumovirus humano 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	-
Bocavirus	-	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.	-	Rhinovirus type C	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A (H1N1 pdm09). Strain A/Michigan/45/2015 (vaccine strain)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A (H1N1) pdm09- virus. Strain A/California/7/2009/ (vaccine strain).	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotype A	-	Influenza A, B and H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) ; A/Victoria/210/2009 (H3N2) (Cepa similar a 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 (Cepa similar a 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	-	RSV A	-
Coronavirus MERS	-	<i>Legionella bozemanii</i> Serovar 1	-	RSV B	-
Coronavirus NL63	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-		

Tabla 12. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en el estudio, llevado a cabo en las instalaciones de CerTest.

Interferencias e inhibidores de PCR

Ninguna sustancia endógena o exógena interfiere con el VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

12.3.2. Reactividad analítica

Reactividad analítica: evaluación *in silico*

La reactividad analítica (inclusividad) se evaluó utilizando bases de datos de secuencias de nucleótidos disponibles públicamente y herramientas de búsqueda y/o alineación como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Mafft Alignment (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) y Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Los análisis bioinformáticos mostraron que los primers y sondas seleccionadas coincidían con secuencias de ácido nucleico de *Pneumocystis jirovecii*

Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente al DNA de las siguientes cepas provenientes de paneles EQA programas QCMD, con resultado positivo:

- *Pneumocystis jirovecii*

- *Pneumocystis jirovecii* Type 1A
- *Pneumocystis jirovecii* g885652
- *Pneumocystis jirovecii* j888023

13. Características del funcionamiento clínico

Las características del funcionamiento clínico de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit se probaron utilizando muestras clínicas respiratorias de pacientes con sospecha de infección por *Pneumocystis jirovecii*. Para determinar la precisión del diagnóstico clínico, se realizaron diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales e internacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de los centros, el tipo de muestra y el flujo de trabajo:

	Sitio	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS, Zaragoza, Spain)	Esputo Lavado broncoalveolar	sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos (EZ1, Qiagen) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
2	Medical School of the Universidad de la República - EdelaR (Uruguay)	Lavado broncoalveolar	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
3	Certest Biotec S.L. and Biobanco of the Sistema de Salud de Aragón (Zaragoza, Spain)	Esputo Lavado broncoalveolar Aspirados broncoalveolares	MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) + LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>

Tabla 13. Sitio, tipo de muestra, flujo de trabajo y diana.

Se calcularon los valores verdaderos positivos y negativos, los valores falsos positivos y negativos, la sensibilidad, la especificidad, el PPV y el NPV de VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit en relación con cada ensayo de comparación, como se muestra en la tabla siguiente:

Sitio	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	FTD <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Fast-Track Diagnostics)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	11	3	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.29-1)	1 (0.74-1)	1 (0.43-1)
2	Análisis de rutina + RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR Kit (Altona Diagnostics)	<i>P. jirovecii</i> infección	11	33	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.89-1)	1 (0.67-1)	1 (0.87-1)
		<i>P. jirovecii</i> colonización	1	43	0	0	1 (0.02-1)	1 (0.91-1)	1 (0.05-1)	1 (0.89-1)
3	RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR (Altona Diagnostics)	<i>P. jirovecii</i> (BAS)	8	307	0	0	1 (0.63-1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.63-1)	1 (0.98 – 1)
		<i>P. jirovecii</i> (esputo)	2	233	0	0	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.15-1)	1 (0.98 – 1)
		<i>P. jirovecii</i> (Total)	10	702	0	0	1 (0.69-1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.69-1)	1 (0.99 – 1)

Tabla 14. Valores verdaderos positivos (TP) y verdaderos negativos (TN), valores falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV) y valores predictivos negativos (NPV) para VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar DNA de *Pneumocystis jirovecii* utilizando VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit.

ANEXO 1

OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, low profile	VS-JIR102L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, high profile	VS-JIR102H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-JIR106L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-JIR106H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-JIR112L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-JIR112H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-JIR113L
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-JIR113H
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 4 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR102
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR136
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR172

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	<i>mtLSU rRNA</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

*Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A1.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 8-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	2/6/12 tiras de 8 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	2/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1.3. Reactivos y materiales proporcionados VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-JIR102L, VS-JIR102H, VS-JIR106L, VS-JIR106H, VS-JIR112L y VS-JIR112H.

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

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 96-well plate	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1 placa
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1.8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Table A1 6. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref VS-JIR113L y VS-JIR113H.

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

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 4-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Transparente	4/9/18 tiras de 4 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1.8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL

Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strip	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	4/9/18 tiras de 4 tapones

Table A1 7. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref Ref. VS-JIR101, VS-JIR136 y VS-JIR172. Para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 mL (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

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

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo

Los viales de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y *Pneumocystis jirovecii* Quantitative contienen una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlos y manipularlos en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Pneumocystis jirovecii* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada, y el *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

A1.3.2 Protocolo PCR

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

Tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, recorte cuidadosamente los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el sello protector de aluminio de las placas o tiras que necesite para el ensayo.

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

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control reconstituido (vial rojo) y Negative Control (vial morado) para ensayos cualitativos, o las diluciones para la curva estándar (ensayos cuantitativos) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatibles con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

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

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Pneumocystis jirovecii*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-JIR196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	<i>mtLSU rRNA</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

*Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Reaction-Mix tube	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	4 viales
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1.8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1.9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-JIR196T.

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

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo

Los viales de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y *Pneumocystis jirovecii* Quantitative contienen una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlos y manipularlos en una zona del laboratorio

separada del resto de los componentes. Reconstituir *Pneumocystis jirovecii* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada, y el *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrir y manipular *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix tube en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C o 4°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control reconstituido (vial rojo) y Negative Control (vial morado) para ensayos cualitativos, o de diluciones para la curva estándar (ensayos cuantitativos) en diferentes pocillos y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

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

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Pneumocystis jirovecii*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 3

OPEN FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, low profile	VS-JIR102LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 8-well strips, high profile	VS-JIR102HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-JIR106LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-JIR106HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-JIR112LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-JIR112HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-JIR113LE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-JIR113HE
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 4 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR102E
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR136E
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-JIR172E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	mtLSU rRNA
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A3. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3, A3.4 y A3.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A3.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 8-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	2/6/12 tiras de 8 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	2/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-JIR102LE, VS-JIR102HE, VS-JIR106LE, VS-JIR106HE, VS-JIR112LE y VS-JIR112HE.

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

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 96-well plate	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1 plato
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1.8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref VS-JIR113LE y VS-JIR113HE.

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

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> 4-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Transparente	4/9/18 tiras de 4 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1.8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1.9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strip	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	4/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit conRef. VS-JIR102E, VS-JIR136E y VS-JIR172E. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

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

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 μL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y/o *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo

Los viales de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y *Pneumocystis jirovecii* Quantitative contienen una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlos y manipularlos en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Pneumocystis jirovecii* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada, y el *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 μL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

A3.3.3 Protocolo PCR

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

Tener en cuenta: En caso de que el número de reacciones requeridas/necesitadas sea menor que el suministrado en una tira, antes de retirar el sello protector, recortar cuidadosamente los pocillos necesarios y guardar el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retirar el sello protector de aluminio de las tiras necesarias para el ensayo.

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

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (sobre de aluminio, vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo, o 5 µL de las diluciones de la curva estándar para el ensayo cuantitativo en los pocillos correspondientes.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra/control positivo/control negativo.

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

Colocar las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

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

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

Tabla A3. 6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Pneumocystis jirovecii*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.cerTEST.es).

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-JIR196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM	<i>mtLSU rRNA</i>
Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Tabla A4. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Reaction-Mix tube	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	2 viales
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Quantitative Standard	Quantitative Standard	2x10 ⁷ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-JIR196TE.
* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y/o *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado y estándar cuantitativo

Los viales de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control y *Pneumocystis jirovecii* Quantitative contienen una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlos y manipularlos en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Pneumocystis jirovecii* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada, y el *Pneumocystis jirovecii* Quantitative Standard liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

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

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrir y manipular *Pneumocystis jirovecii* Diseases Reaction-Mix tube en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C o 4°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A4.3.4 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *Pneumocystis jirovecii* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Pneumocystis jirovecii* Positive Control (sobre de aluminio, vial rojo) en los pocillos reservados para el control positivo, o 5 µL de las diluciones de la curva estándar para el ensayo cuantitativo en los pocillos correspondientes.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra/control positivo/control negativo.

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

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

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Pneumocystis jirovecii*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

1. Truong J, Ashurst JV. Pneumocystis jirovecii Pneumonia. 2023 Jan 21. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29493992.
2. Harris, J.R., Balajee, S.A. & Park, B.J. **Pneumocystis Jirovecii** Pneumonia: Current Knowledge and Outstanding Public Health Issues. *Curr Fungal Infect Rep* **4**, 229–237 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12281-010-0029-3>
3. "Diagnosing Pneumocystis jirovecii pneumonia: A review of current methods and novel approaches" Marjorie Bateman, Rita Oladele, and Jay K Kolls *Med Mycol*. 2020 Nov; 58(8): 1015–1028. Published online 2020 May 13. doi: 10.1093/mmy/myaa024 PMID: 32400869

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

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

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

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

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version* Changes made to the previous instructions for use: All instructions applicable to this product have been unified in one document. Sections 2,3,4,5 and 6 are modified to improve: The explanation of the principle of the procedure (3. Principle of the procedure), include reagents provided and their concentrations in the product in Annexes. (4. Reagents provided). Better explanation of the list of reagents and equipment to be supplied by the user and the conditions of transport and storage. (5. Reagents and equipment to be supplied by the user and 6. Transport and storage conditions). Section 7 "Precautions for Users" has been updated to better explain some precautions. Section 8.1 Specimen collection, transport and storage and 8.2 "DNA extraction" has been updated. More validated extraction systems have been included during new follow-up clinical evaluations. In addition, the extraction procedure has been better explained. Updated Section 9 "Interpretation of Results" to better explain how to interpret controls and patient samples. Section 10 "Limitations" has been updated to better explain some limitations. Section 12. Analytical performance characteristics and 13. Clinical performance characteristics has been updated following the data obtained during the PMPF evaluations. The test procedure (Included in the Annexes) for positive control	24/08/2023

	lyophilization has been updated. / Cambios realizados en las instrucciones de uso anteriores: Se han unificado todas las instrucciones aplicables a este producto en un solo documento. Se modifican los Apartados 2,3,4,5 y 6 para mejorar: La explicación del principio del procedimiento (3. Principio del procedimiento). Incluido los reactivos proporcionados y sus concentraciones en Anexos. (4. Reactivos proporcionados). Mejor explicación de la lista de reactivos y equipos a suministrar por el usuario y las condiciones de transporte y almacenamiento. (5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario y 6. Condiciones de transporte y almacenamiento). Se actualizó la Sección 7 "Precauciones para los usuarios" para explicar mejor algunas precauciones. Se ha actualizado la Sección 8.2 "Extracción de DNA". Se han incluido más sistemas de extracción validados durante las nuevas evaluaciones clínicas de seguimiento. Además, se ha explicado mejor el procedimiento de extracción. Se actualizó la Sección 9 "Interpretación de los resultados" para explicar mejor cómo interpretar los controles y las muestras de pacientes. La Sección 10 "Limitaciones" se ha actualizado para explicar mejor algunas limitaciones. Las Secciones 12. Características del rendimiento analítico y la 13. Características del rendimiento clínico se han actualizado en función de los datos obtenidos en el PMPF. El procedimiento (incluido en los Anexos) para la rehidratación del control positivo se ha actualizado.	
--	--	--

Table A 5. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

* Internal traceability info: This document is based on the following versions of the previous Instructions for use (IU-JIR012Eenes0519 rev.05, IU-JIR012Eenes0519 rev.02, IU-JIR196Tenes1218 rev.00 and IU-JIR196TEenes0221 rev.00). However, due to this update the content and configuration have changed completely and this version has been established to be the original version.

Revision: 24th August 2023

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead

F-566 rev02