

## RIDA® GENE *Mycoplasma pneumoniae*

**REF** PG4305



## 1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Mycoplasma pneumoniae es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Mycoplasma pneumoniae* en secreciones traqueales, esputos y líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humanos.<sup>1</sup>

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Mycoplasma pneumoniae está concebido como una ayuda para el diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por *Mycoplasma pneumoniae*.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

La neumonía contraída en la comunidad (NCC) es la enfermedad infecciosa con mayor registro en todo el mundo y en los países occidentales, es la que causa mayor mortalidad. En Alemania, puede haber hasta 800 000 casos de NCC al año y la tasa de mortalidad varía (en función de si se contrae en la comunidad o en un hospital) entre el 2 % y el 60 %. Las bacterias son el patógeno más frecuente en las NCC, y puede diferenciarse entre patógenos típicos y atípicos. Las bacterias atípicas no se pueden cultivar a partir de esputos o sangre, y no pueden visualizarse mediante tinción de Gram. Esto hace que el diagnóstico de las bacterias atípicas de la NCC por técnicas convencionales sea casi imposible. Una de las bacterias de NCC más frecuentes es *Mycoplasma pneumoniae*. Hasta el 20 % de los casos de neumonía contraída en la comunidad son causados por *M. pneumoniae*.<sup>2</sup>

*M. pneumoniae* es una bacteria sin pared celular, sumamente contagiosa, que pertenece a la familia *Mycoplasmataceae*. La infección se transmite principalmente por pequeñas gotas, o por contacto directo o indirecto por suciedad. El periodo de incubación va de 1 a 4 semanas. *M. pneumoniae* no forma parte de la flora normal humana, y se detecta principalmente en los niños y adultos jóvenes. En el 5 – 25 % de las infecciones por *M. pneumoniae*, el paciente desarrollará neumonía que requerirá tratamiento con antibióticos. En Estados Unidos, hay 2 millones de casos al año, 100 000 de los cuales son motivo de hospitalización del paciente.

## 3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Mycoplasma pneumoniae es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Mycoplasma pneumoniae* en secreciones traqueales, esputos y líquido de lavado broncoalveolar (LBA).

Después del aislamiento del ADN, ocurre la amplificación de los fragmentos génicos (IGS, si está presente) específicos de *Mycoplasma pneumoniae*. La diana amplificada de *Mycoplasma pneumoniae* se detecta mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones.

Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE *Mycoplasma pneumoniae* contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

#### 4. Reactivos suministrados

**Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)**

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1,700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Control positivo	1x	200 µl	azul

#### 5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado y por completo los reactivos antes de utilizarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta **20 ciclos de congelación/descongelación** sin que esto afecte la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de forma adecuada (2 - 8 °C).

## 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Mycoplasma pneumoniae es adecuado para usarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

**Tabla 2** Equipo validado:

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II y el LightCycler® 480 z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0.5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas)

## 7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución del ensayo. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la

ejecución del ensayo. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

### 8.1 Preparación de las muestras de secreciones traqueales, esputos o lavado broncoalveolar

Para el aislamiento del ADN a partir de secreciones traqueales, esputos o lavado broncoalveolar, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Mycoplasma pneumoniae contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## 9. Ejecución del ensayo

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo deben incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3, 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

**Tabla 3:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

**Tabla 4:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
D	Internal Control DNA	1.0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21.0 µl</b>	<b>231.0 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

## 9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

**Control negativo:** Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

**Muestra:** Agregue 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

**Control positivo:** Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúgelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7, 8).

### 9.3 Configuración del equipo de PCR

#### 9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

**Tabla 5:** Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

**Tabla 6:** Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura /Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

### 9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

**Nota:** El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

**Tabla 7:** Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

**Tabla 8:** Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, CFX96™ y Rotor-Gene Q

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

## 9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICD	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICD	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	

Nota: Cuando se usa con el LightCycler® 2.0, «Seek Temperature» (temperatura de búsqueda) debe aumentarse de «30» a «58».

## 10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias.

**Tabla 10:** Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND * <sup>1</sup>	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

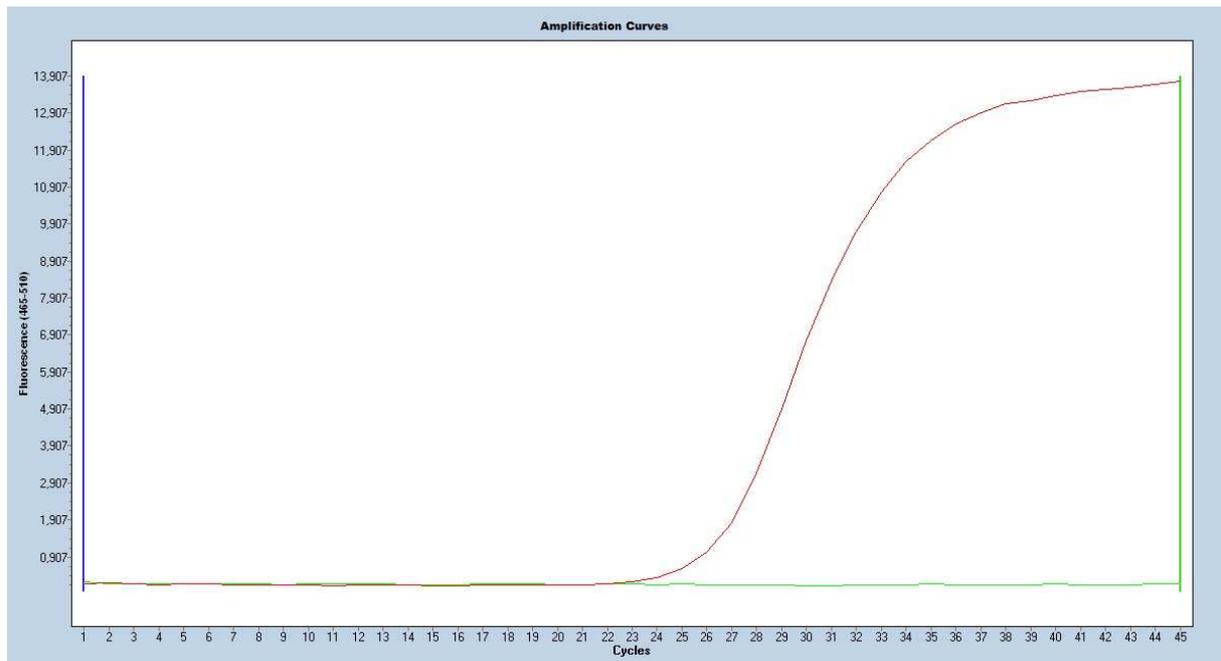
*\*<sup>1</sup> No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.*

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta del ensayo



**Fig. 1:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Mycoplasma pneumoniae*) en el LightCycler® 480II

## 11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

**Tabla 11:** Interpretación de las muestras

Gen diana		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	<i>M. pneumoniae</i> detectado
negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	No válido

Se detecta *Mycoplasma pneumoniae* si el ADN de la muestra y el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se detecta *Mycoplasma pneumoniae* si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control DNA** no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

No se detecta *Mycoplasma pneumoniae* si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del ADN del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

## 12. Limitaciones del método

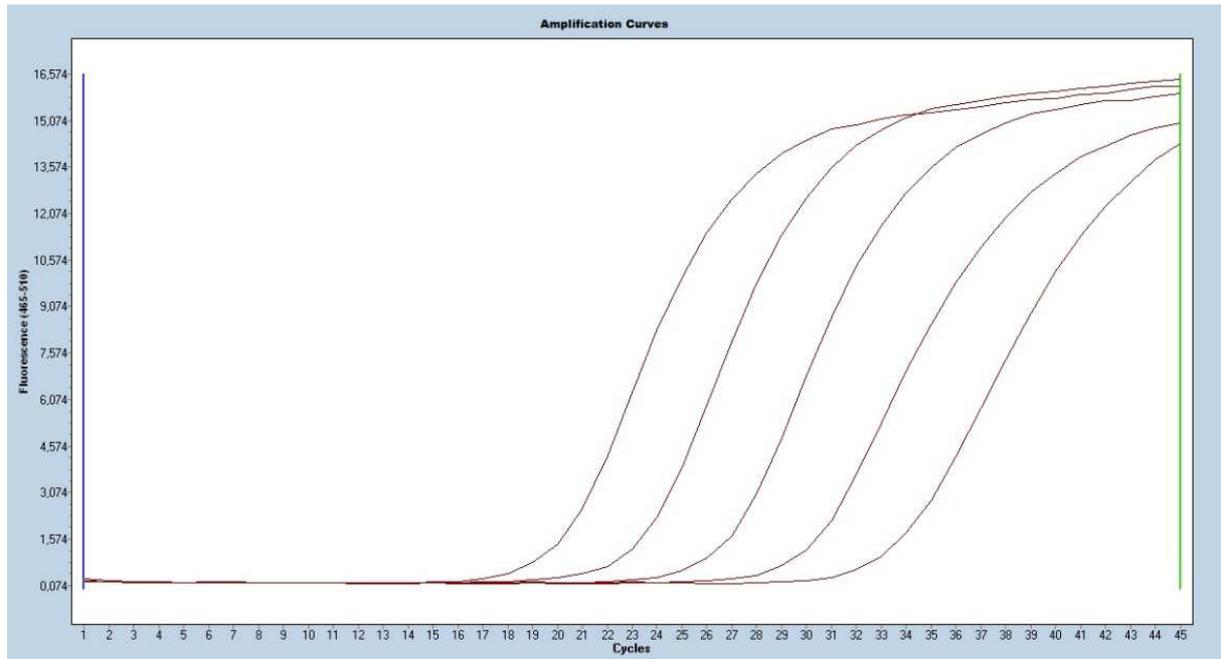
1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo está validado solo para muestras de secreciones traqueales, esputos y LBA.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA<sup>®</sup> GENE *Mycoplasma pneumoniae*.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana (IGS).

## 13. Características de rendimiento

### 13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Mycoplasma pneumoniae tiene un límite de detección  $\geq 10$  copias de ADN por reacción para *Mycoplasma pneumoniae*.

La figura 2, a continuación, muestra una dilución seriada de *Mycoplasma pneumoniae* ( $10^5$  -  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II.



**Fig. 2:** Dilución seriada de *Mycoplasma pneumoniae* ( $10^5$  –  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

### 13.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE *Mycoplasma pneumoniae* es específica para *Mycoplasma pneumoniae*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 13):

**Tabla 13:** Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	Ecovirus tipo 11	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Virus paragripal, serotipo 3	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	Enterovirus tipo 71	-	<i>Legionella longbeacheae</i>	-	Virus paragripal 4b, humano, cepa CH19503	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	Virus sincitial respiratorio, humano, cepa 9320	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	<i>Mycoplasma fermentas</i>	-	Virus sincitial respiratorio, humano, cepa Long	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Rinovirus genogrupo A, humano	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	Metaneumovirus humano	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Virus de la gripe, infeccioso, A/PR/8/34	-	Virus paragripal 1, humano, cepa C35	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
Coronavirus 229E, humano	-	Virus de la gripe B (B/Lee/40)	-	Virus paragripal 2, humano, cepa Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus coxsackie B4, humano	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-		-		-

## 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2014-10-29	Versión de lanzamiento
2018-06-14	Revisión general
2018-06-14	4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9. Ejecución del ensayo 10. Control de calidad 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

## 15. Explicación de los símbolos

### Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte las instrucciones de uso.
	Número de lote
	Caducidad
	Almacene a
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

## 16. Bibliografía

1. Qasem JA, *et al.* Polymerase chain reaction as a sensitive and rapid method for specific detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Microbiol. Res.* 2002, 157:77-82.
2. Touati *et al.* Evaluation of five commercial real-time PCR assays for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 2269-2271.
3. <http://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>, accessed 29.10.2014