

RIDA® GENE *Mycoplasma pneumoniae*

REF PG4305



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®]GENE *Mycoplasma pneumoniae* è un test di PCR real time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta del *Mycoplasma pneumoniae* in campioni di secrezione tracheale, espettorato e fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL) umani.¹

Il test RIDA[®]GENE *Mycoplasma pneumoniae* PCR real-time multiplex è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi delle infezioni respiratorie causate da *Mycoplasma pneumoniae*.

2. Sintesi e spiegazione del test

La polmonite acquisita in comunità (CAP) è la malattia infettiva più registrata al mondo e la più mortale nei paesi occidentali. In Germania, si verificano ogni anno fino a 800.000 casi di CAP e il tasso di mortalità varia, a seconda che sia acquisita in comunità o in ospedale, tra il 2 e il 60 %. I batteri sono gli agenti patogeni più comuni della CAP e si differenziano in tipici e atipici. I batteri atipici non possono essere coltivati in espettorato o sangue e non sono visibili mediante colorazione gram. Questo rende quasi impossibile la diagnosi dei batteri atipici della CAP mediante le tecniche standard. Uno dei batteri atipici più ricorrenti della CAP è il *Mycoplasma pneumoniae*. Fino al 20 % dei casi di polmoniti acquisite in comunità è causato da *M. pneumoniae*.²

M. pneumoniae è un batterio altamente contagioso, privo di parete cellulare, e appartiene alla famiglia delle *Mycoplasmataceae*. Si trasmette principalmente attraverso goccioline aeree infette o attraverso il contatto diretto o indiretto attraverso oggetti contaminati. Il periodo di incubazione è di 1 – 4 settimane. Il *M. pneumoniae* non fa parte della normale flora batterica umana ed è più frequentemente rivelato nei bambini e nei giovani adulti. Nel 5 - 25 % delle infezioni da *M. pneumoniae*, si sviluppano polmoniti che richiedono un trattamento antibiotico. Negli Stati Uniti, si verificano ogni anno 2 milioni di casi, dei quali 100.000 determinano l'ospedalizzazione del paziente.

3. Principio del test

RIDA[®]GENE *Mycoplasma pneumoniae* è un test di PCR real time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta del *Mycoplasma pneumoniae* in campioni di secrezione tracheale, espettorato e fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL).

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione del frammento genetico (IGS, se presente) specifico per il *Mycoplasma pneumoniae*. Il target amplificato per il *Mycoplasma pneumoniae* viene rivelato con sonde ad idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di

estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA[®]GENE *Mycoplasma pneumoniae* contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione del campione e/o per determinare la possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongellare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (es. in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a **20 cicli di congelamento/scongellamento** senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test PCR real-time multiplex RIDA[®]GENE Mycoplasma pneumoniae è adatto per l'uso con le seguenti piattaforme di estrazione e strumenti per la PCR real-time:

Tab. 2 Attrezzatura convalidata:

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler[®] 2.0
- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler[®] 480II e LightCycler[®] 480 z
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (grado bioscientifico, priva di nucleasi)

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione dei campioni di secrezione tracheale, espettorato o lavaggio broncoalveolare

Per l'isolamento del DNA da secrezione tracheale, espettorato o lavaggio broncoalveolare, utilizzare un kit di isolamento del DNA (ad es. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione del DNA (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)) disponibili in commercio. Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA[®] GENE Mycoplasma pneumoniae contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control DNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

Tab. 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tab. 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
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
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

Campione: dispensare 5 µl di estratto di DNA alla Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

Tab. 5: Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 6: Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.3.2 Profilo PCR real-time universale

Nota: il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tab. 7: Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 8: Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, CFX96™ e Rotor-Gene Q

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 2.0	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	530	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni
	ICD	Giallo	

Nota: per l'uso con il LightCycler® 2.0, il valore del parametro "Seek Temperature" deve essere aumentato da "30" a "58".

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tab. 10: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA ^{*1}	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

^{*1} Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

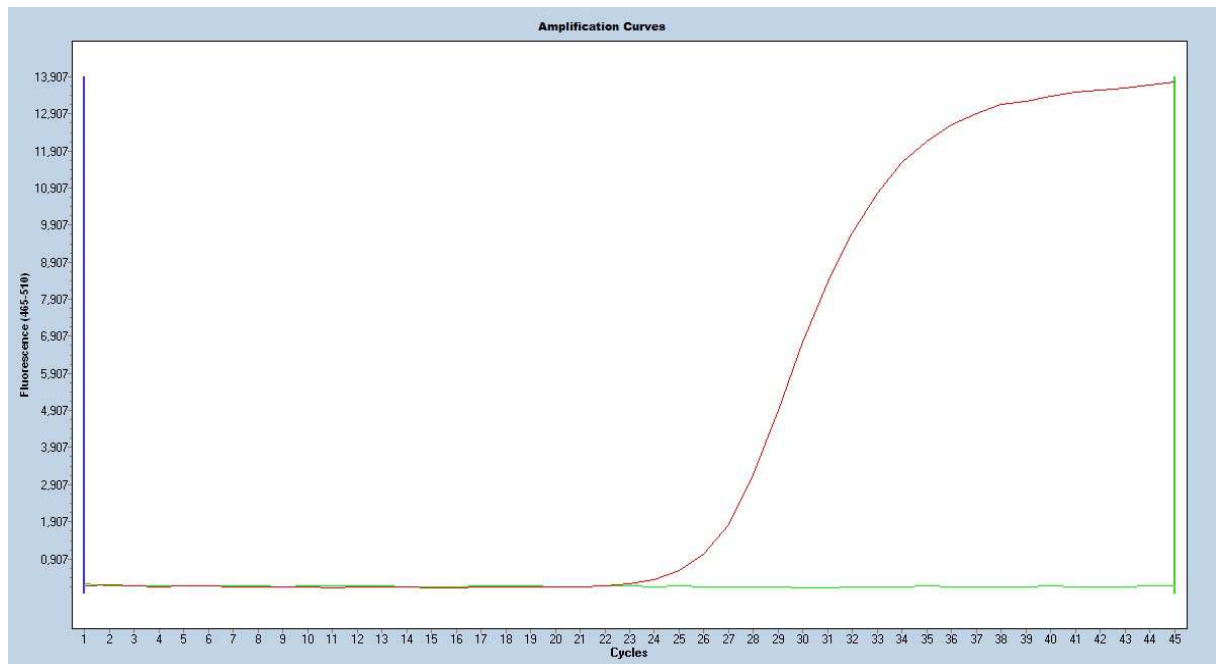


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Mycoplasma pneumoniae*) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tab.11: Interpretazione del campione

Gene target		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Risultato
positivo	positivo/negativo	<i>M. pneumoniae</i> rivelato
negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	Non valido

Viene rivelato il *Mycoplasma pneumoniae* se sia il DNA del campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Il *Mycoplasma pneumoniae* è inoltre comprovabile se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'**Internal Control DNA** è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'**Internal Control DNA** sia debole o assente.

Il *Mycoplasma pneumoniae* non è comprovabile se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione è presente un segnale per l'**Internal Control DNA**. La rivelazione dell'**Internal Control DNA** esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'**Internal Control DNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rilevazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di secrezione tracheale, espettorato e BAL.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti con il test RIDA[®] GENE *Mycoplasma pneumoniae* e causare un falso negativo.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target (IGS).

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA® GENE Mycoplasma pneumoniae PCR real-time multiplex ha un limite di rivelazione ≥ 10 copie di DNA per reazione per il *Mycoplasma pneumoniae*.

La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di *Mycoplasma pneumoniae* (10^5 - 10^1 copie di DNA per μl) su LightCycler® 480II.

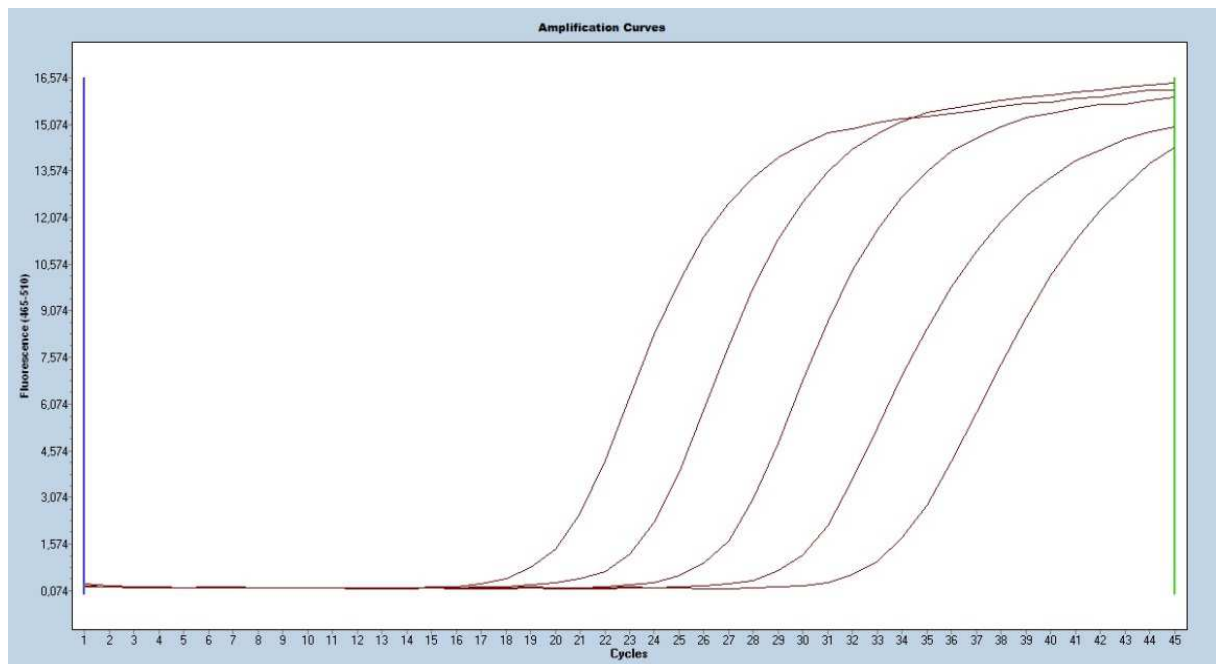


Fig. 2: Serie di diluizione del *Mycoplasma pneumoniae* (10^5 – 10^1 copie di DNA per μl) sul LightCycler® 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

13.2 Specificità analitica

La specificità analitica del test RIDA® GENE Mycoplasma pneumoniae PCR real-time multiplex è specifica per il *Mycoplasma pneumoniae*. Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 13):

Tab. 13: Test di reattività crociata










Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	Echovirus Tipo 11	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Virus parainfluenzale umano sierotipo 3	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	Enterovirus Tipo 71	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus parainfluenzale umano 4b, ceppo CH19503	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. <i>pneumophila</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	<i>Mycoplasma fermentas</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Rhinovirus, genogruppo A, umano	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	Metapneumovirus umano	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Virus dell'influenza, infettivo A/PR/8/34	-	Virus parainfluenzale 1, ceppo umano C35	-	<i>Staphylococcus hominis</i> sottosp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
Coronavirus 229E, umano	-	Influenza B (B/Lee/40)	-	Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Coxsackie B4, umano	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-		-		-

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2014-10-29	Versione di rilascio
2018-06-14	Revisione generale
2018-06-14	4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel test

Non pertinente

16. Bibliografia

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