



## RIDA<sup>®</sup> GENE CAP Bac

**REF** PG2705



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany  
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



Deutsch .....	3
English.....	29
Español.....	53
Français.....	79
Italiano .....	105

# RIDA®GENE CAP Bac

**REF** PG2705

## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE CAP Bac ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae* in humaner bronchoalveolärer Lavage (BAL).

Die RIDA®GENE CAP Bac multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* oder *Mycoplasma pneumoniae* verursachten ambulant erworbenen Pneumonie (engl. community acquired pneumonia, CAP) unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die ambulant erworbene Pneumonie (engl. *community acquired pneumonia*, CAP) ist weltweit die am häufigsten registrierte Infektionskrankheit und in den westlichen Nationen die häufigste zum Tode führende Infektionskrankheit. In Deutschland gibt es jährlich bis zu 600.000 Fälle von CAP und die Mortalität variiert, abhängig von ambulanter oder stationärer CAP, zwischen 0,6 – 14 %.<sup>1</sup> Bakterien sind die häufigsten Erreger einer CAP, wobei man zwischen typischen und atypischen Erregern unterscheidet. Atypische Bakterien können in einer regulären Kultur aus Sputum oder Blut nicht kultiviert werden und sind auch nicht durch Gram-Färbungen sichtbar. Dies erschwert den Nachweis atypischer CAP-Bakterien, da die Standardmethoden eine Identifikation meist nicht möglich machen. Zu den häufigsten atypischen CAP-Bakterien zählen *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Legionella* spp. und *Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*).<sup>2</sup>

Bis zu 20 % der ambulant erworbenen Pneumonien werden durch *M. pneumoniae* ausgelöst.<sup>3</sup> *M. pneumoniae* ist ein zellwandloses, hochansteckendes Bakterium, welches primär aerogen über Tröpfchen oder durch direkten oder indirekten Kontakt über Schmierinfektionen übertragen wird. *M. pneumoniae* gehört nicht zur Normalflora des Menschen und wird meist in Kindern und jungen Erwachsenen detektiert. In 5 – 25 % einer *M. pneumoniae*-Infektion entwickelt sich eine Pneumonie, die eine weitere Behandlung, meist mit Antibiotikum, mit sich zieht.<sup>4</sup>

*Chlamydophila pneumoniae* ist ein gram-negatives Bakterium und wird meist aerogen übertragen.<sup>5</sup> Eine Infektion mit *C. pneumoniae* ist meist hartnäckig aber mild.<sup>5,6</sup> Es wird geschätzt, dass *C. pneumoniae* eine Durchseuchungsrate von 50 –

70 % hat und 60 % der Bevölkerung bis zum 20. Lebensjahr eine *C. pneumoniae*-Infektion durchgemacht haben. Eine schwere Verlaufsform kann zu einer atypischen Pneumonie führen. In Deutschland wird geschätzt, dass bis zu 5 % der CAP-Pneumonien durch *C. pneumoniae* hervorgerufen werden.<sup>1,5</sup> Das Bakterium kann viele Jahre im oberen Respirationstrakt verbleiben, sodass die Ansteckungsfähigkeit über lange Zeit bestehen kann. Klassische Antigen-Nachweismethoden, wie ELISA, haben nur eine geringe Spezifität und sind erst nach mehreren Wochen einer akuten Infektion einsetzbar. Mit der PCR kann der Erreger nachweis sicher aus respiratorischen Proben oder Gewebe gelingen.<sup>5</sup>

Die Gattung der Legionellen gehört zur Familie der *Legionellaceae* und wird in über 40 Spezies mit mehr als 70 Serogruppen unterteilt. Legionellen sind fakultative, intrazelluläre gram-negative Bakterien und haben ihren Infektionspeak in den Sommer- und frühen Herbstmonaten. Legionellen-Erkrankungen werden zwischen ambulant erworbenen, reisebedingten und nosokomialen Infektionen unterschieden. In den USA liegt die Mortalitätsrate nosokomialer Infektionen zwischen 15 – 20 %. In Europa verlaufen 12 % aller Legionellen-Infektionen tödlich.<sup>7</sup> Alle Legionellen-Spezies sind als potenziell humanpathogen einzustufen. In Europa werden aber die meisten ambulant erworbenen Erkrankungen durch Erreger der Spezies *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 verursacht. Eine Infektion mit *Legionella pneumophila* führt hauptsächlich zur Legionärskrankheit (auch Legionellose genannt).<sup>8</sup>

### 3. Testprinzip

RIDA®GENE CAP Bac ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae* in humaner bronchoalveolärer Lavage (BAL). Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Chlamydophila pneumoniae* (16S-rRNA), *Legionella pneumophila* (16S-rRNA) und *Mycoplasma pneumoniae* (IGS) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE CAP Bac Test enthält eine **Internal Control DNA** (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

#### 4. Packungsinhalt

**Tab. 1:** Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

#### 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

## **6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör**

Der RIDA®GENE CAP Bac multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

**Tab. 2:** Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäß verwenden**

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und des LightCycler® 480 z
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäß, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäß oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

## **7. Vorsichtsmaßnahmen**

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

### **7.1 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen**

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten und vor Gebrauch des Tests sorgfältig zu lesen.

Biologische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend behandelt und entsorgt werden. Den direkten Kontakt mit biologischen Proben vermeiden. Verspritzen oder Versprühen vermeiden. Materialien, die in Kontakt mit biologischen Proben gekommen sind, müssen mindestens nach geltenden Vorschriften entsorgt werden. Brennbare Einwegmaterialien müssen verbrannt werden. Flüssigabfall, welcher Säuren oder Basen enthält, muss vor der Entsorgung neutralisiert werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich nach adäquaten Sicherheitsstandards entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille, Gesichtsschutz) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände sorgfältig waschen. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen gearbeitet wird, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetikprodukte verwenden. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Nur die Reagenzien, die mit dem Produkt zur Verfügung gestellt und vom Hersteller empfohlen werden, verwenden. Keine Reagenzien aus anderen Chargen verwenden. Keine Reagenzien von anderen Herstellern verwenden.

## **7.2 Molekularbiologische Vorsichtsmaßnahmen**

Für molekularbiologische Verfahren, wie Nukleinsäure -Extraktion, -Amplifikation und -Nachweis, wird qualifiziertes und geschultes Laborpersonal benötigt, um das Risiko von fehlerhaften Ergebnissen, insbesondere durch die Degradierung der in den Proben enthaltenen Nukleinsäure oder durch Kontamination von Proben mit Amplifikationsprodukten zu vermeiden.

Bei einer manuellen Abarbeitung ist eine räumliche Trennung von Probenvorbereitung/Extraktion, PCR-Ansatz und PCR zu beachten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bitte bringen Sie nie Amplifikationsprodukte in den Bereich der Probenvorbereitung/Extraktion und des PCR-Ansatzes ein. Zudem ist zu beachten, dass für jeden Bereich (Probenvorbereitung/Extraktion, PCR-Ansatz und PCR) getrennte Laborkittel, Handschuhe und Arbeitsgeräte, die nur für den bestimmten Bereich genutzt werden dürfen, benötigt werden. Laborkittel, Handschuhe und Arbeitsgeräte aus dem Bereich der PCR dürfen niemals im Bereich der Probenvorbereitung/Extraktion oder des PCR-Ansatzes verwendet werden.

Die Proben dürfen ausschließlich nur für diese Art der Analyse verwendet werden und müssen unter einer mikrobiologische Sicherheitswerkbank bearbeitet werden. Gefäße mit verschiedenen Proben dürfen niemals gleichzeitig geöffnet werden.

Pipetten, die für die Probenbearbeitung genutzt werden, dürfen ausschließlich nur für diesen Zweck verwendet werden.

Die benötigten Reagenzien müssen unter einer Laminar Flow Werkbank bearbeitet werden. Die zur Amplifikation benötigten Reagenzien müssen so vorbereitet sein, dass sie in einer Testdurchführung verwendet werden können. Pipetten, die für die Reagenzien genutzt werden, dürfen ausschließlich zu diesem Zweck verwendet werden. Es dürfen nur Direktverdrängungspipetten oder Pipetten mit Filter-Pipettenspitzen verwendet werden. Die Pipettenspitzen müssen steril, DNAse- und RNAse- sowie DNA- und RNA-frei sein

Um Kontaminationen zu vermeiden müssen Amplifikationsprodukte so behandelt werden, dass deren Verbreitung in die Umwelt so weit wie möglich vermieden wird. Pipetten, die für Amplifikationsprodukte genutzt werden, dürfen ausschließlich nur für diesen Zweck verwendet werden.

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA-Präparation aus bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Für die DNA Isolierung aus BAL sind Proben zu verwenden, die nach Laborrichtlinien gelagert, jedoch nicht länger als 24 Stunden nach der Entnahme transportiert und gelagert wurden. Proben, die länger als 24 Stunden transportiert und/oder gelagert wurden, sollten für bis zu 72 Stunden bei +2 - +8 °C gelagert werden. Proben die länger als 72 Stunden Tage lagern, sollten bei -70 °C gelagert werden.<sup>9</sup>

Es wird empfohlen, Aliquots der Proben herzustellen, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Gefrorene Proben sollten direkt vor der Extraktion aufgetaut werden, um eine Degradation der Nukleinsäure zu verhindern.

Für die DNA-Präparation aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA®Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE CAP Bac Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Tab. 4:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## 9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäß(e) (Gefäße/Platten) pipettieren.

**Negativkontrolle:** Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

**Proben:** Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäß(e) bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab.8).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 DNA real-time PCR Profil

**Tab. 5:** DNA real-time PCR Profil für LightCycler® Serie Rotor-Gene Q, RIDA®CYCLER

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Tab. 6:** DNA real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

### 9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

**Hinweis:** Das Universal real-time PCR Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

**Tab. 7:** Universal real-time PCR Profil für LightCycler® Serie und RIDA®CYCLER

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Tab. 8:** Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

**Tab. 9:** Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Green	-
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Red	
Roche LightCycler® 480II	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	533/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	610/670	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Red	

## 10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu\text{l}$  vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

**Tab. 10:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * <sup>1</sup>	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

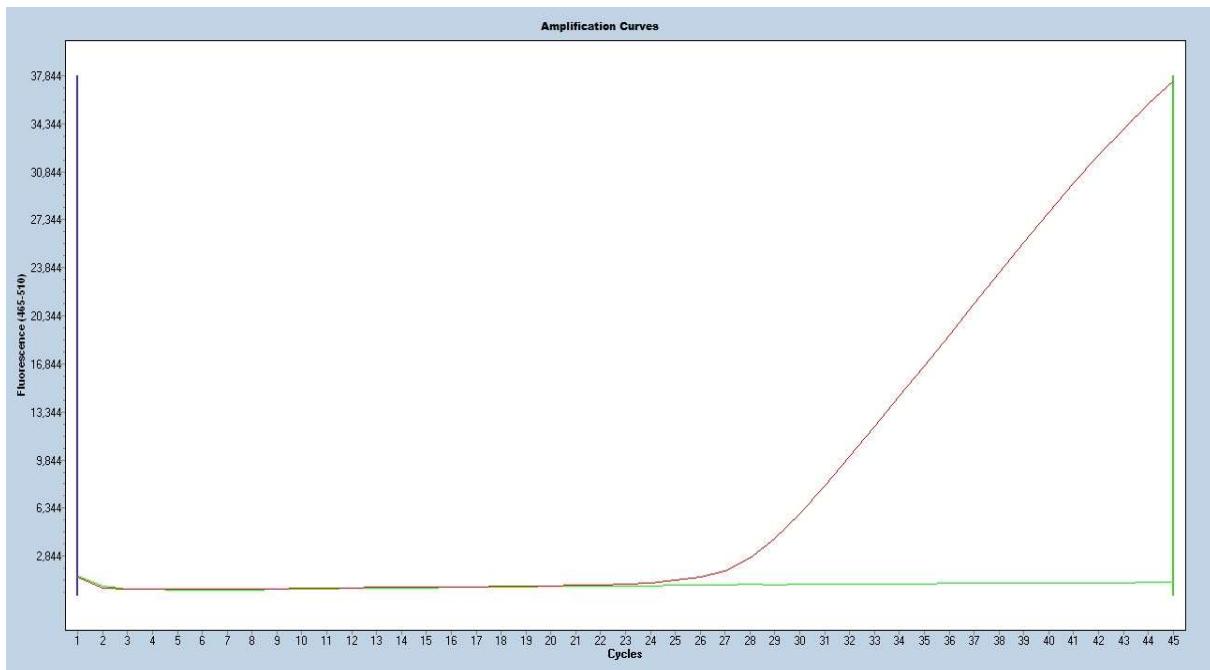
\*<sup>1</sup> Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

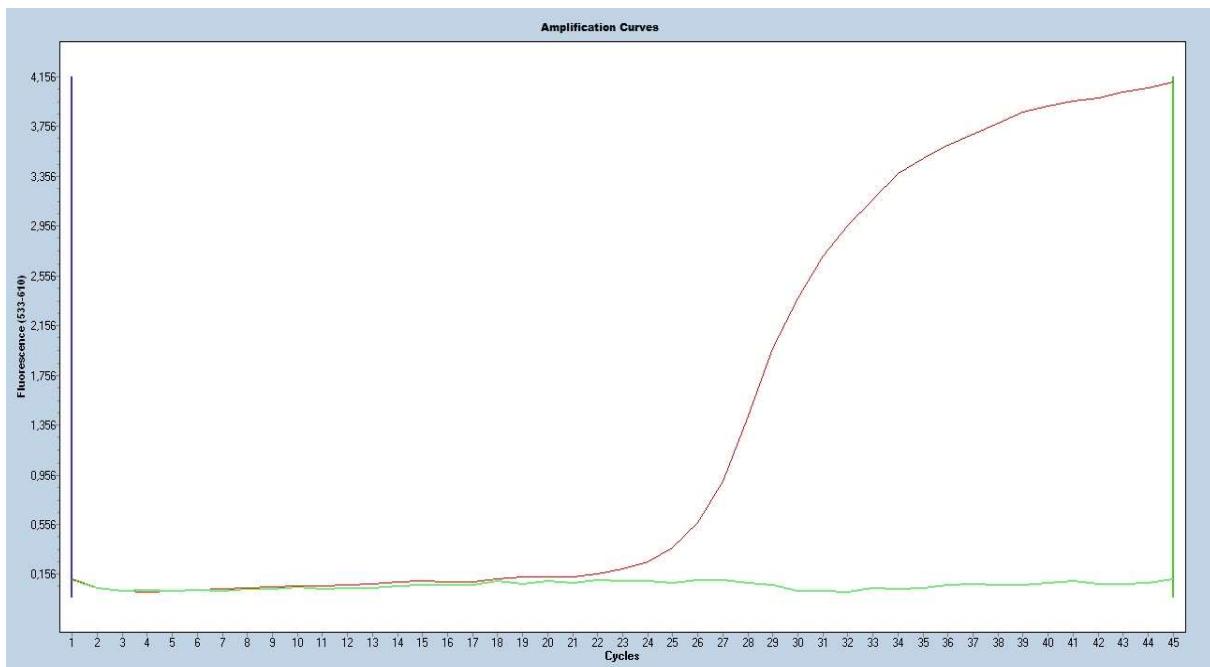
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

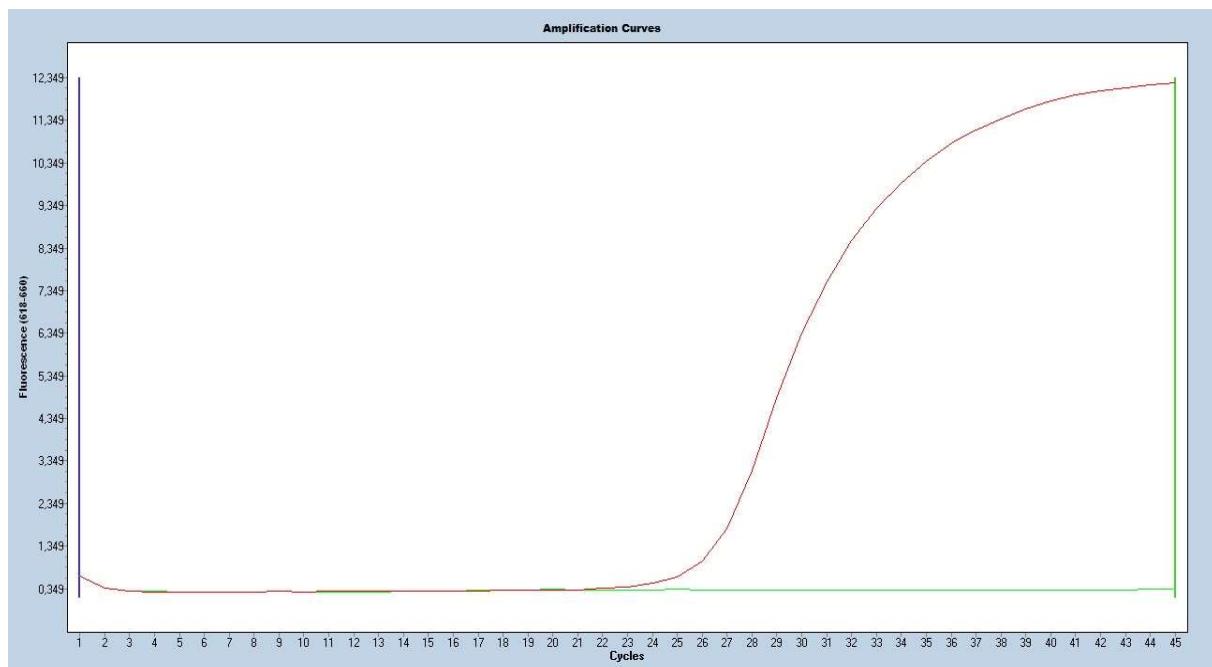
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Chlamydophila pneumoniae*) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Legionella pneumophila*) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 3:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Mycoplasma pneumoniae*) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

**Tab. 11:** Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von				
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	<i>C. pneumoniae</i> nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	<i>L. pneumophila</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	<i>M. pneumoniae</i> nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/ negativ	<i>C. pneumoniae und L. pneumophila</i> nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/ negativ	<i>C. pneumoniae und M. pneumoniae</i> nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/ negativ	<i>L. pneumophila und M. pneumoniae</i> nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/ negativ	<i>C. pneumoniae, L. pneumophila und M. pneumoniae</i> nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control DNA jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die Internal Control DNA jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

## 12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für bronchoalveolare Lavage (BAL) validiert.
3. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
4. Die Ergebnisse, die mit diesem Produkt erzielt werden, sind abhängig von einer adäquaten Probenidentifizierung, -entnahme, -transport, -lagerung und -handhabung. Es ist daher notwendig, diese Schritte sorgfältig durchzuführen und den Vorgaben der Hersteller der Produkte zur Nukleinsäure-Extraktion zu folgen. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Der Verwendung dieses Produkts erfordert Arbeitskleidung und Arbeitsbereiche, die für den Umgang mit potentiell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich klassifizierten chemischen Ansätzen geeignet sind, um Unfälle mit möglicherweise ernsten Folgen für den Anwender und andere Personen zu vermeiden.
6. Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit molekularbiologischen Techniken, wie Extraktion, Amplifikation und Nachweis von Nukleinsäuren geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen falsche Ergebnisse vermieden werden.
7. Bei einer manuellen Abarbeitung ist eine räumliche Trennung von Probenvorbereitung/Extraktion, PCR-Ansatz und PCR zu beachten, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.
8. Bei einer manuellen Abarbeitung werden für die Verwendung des Produkts gesonderte Kleidung und Instrumente für die Probenvorbereitung/Extraktion und den PCR-Ansatz sowie die PCR benötigt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.
9. Wie bei allen auf PCR basierenden in-vitro-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.

10. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
11. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
12. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (*Chlamydophila pneumoniae* (16S-rRNA), *Legionella pneumophila* (16S-rRNA) und *Mycoplasma pneumoniae* (IGS)) vorhanden sind.
13. Die Substanzen Paracodein, Ciprofloxacin und Guaifenesin/Dextromethorphan können bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen.

## **13. Leistungsmerkmale**

### **13.1 Klinische Leistungsfähigkeit**

Die RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac multiplex real-time PCR wurde in einem externen Labor mit den erregerspezifischen real-time PCR-Testverfahren des Labors (analog nach DIN EN ISO 15189:2007 akkreditierten PCR-Testverfahren) mit einem LightCycler<sup>®</sup> 480 II bzw. LightCycler<sup>®</sup> 2.0 verglichen. Insgesamt wurden 282 Rückstellproben von Nukleinsäureextrakten aus respiratorischem klinischem Untersuchungsmaterial (BAL) getestet. In 17 Proben (6 %) war ein invalides Ergebnis aufgrund eines negativen Nachweises der Internen Kontroll-DNA nachweisbar, was auf eine empfindliche Detektion von Inhibitionseignissen durch den RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac Assay hinweist. Diese Proben wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen. Die Ergebnisse für die einzelnen Erreger sind in den Tabellen 12-14 dargestellt:

**Tab. 12:** Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* (CP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>C. pneumoniae</i>		Gesamt			
In-house CP	positiv	positiv	negativ				
	positiv	30	0	30			
	negativ	0	235	235			
Gesamt		30	235	265			
Sensitivität	100,0 %						
Spezifität	100,0 %						
PPW	100,0 %						
NPW	100,0 %						

**Tab. 13:** Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae* (MP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>M. pneumoniae</i>		Gesamt			
In-house MP	positiv	positiv	negativ				
	positiv	50	0	50			
	negativ	0	215	215			
Gesamt		50	215	265			
Sensitivität	100,0 %						
Spezifität	100,0 %						
PPW	100,0 %						
NPW	100,0 %						

**Tab. 14:** Nachweis von *Legionella pneumophila* (LP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>L. pneumophila</i>		Gesamt
In-house LP	positiv	positiv	negativ	
	negativ	5	210	215
	Gesamt	55	210	265

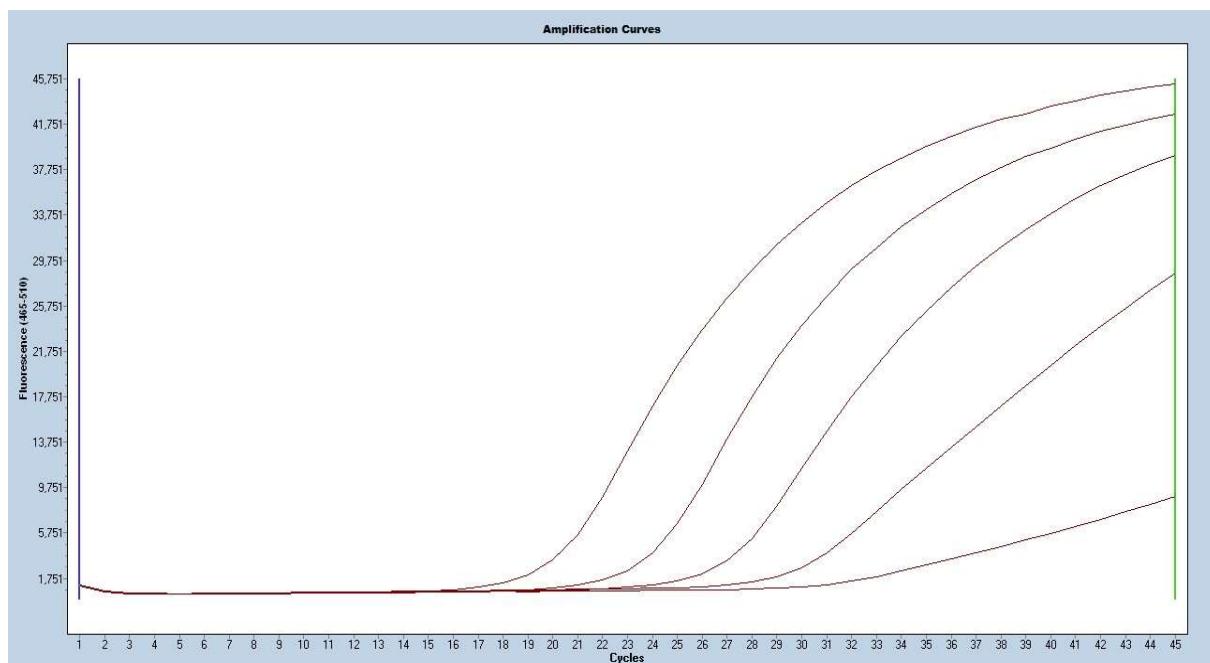
  

Sensitivität	100,0 %
Spezifität	97,7 %
PPW	90,9 %
NPW	100,0 %

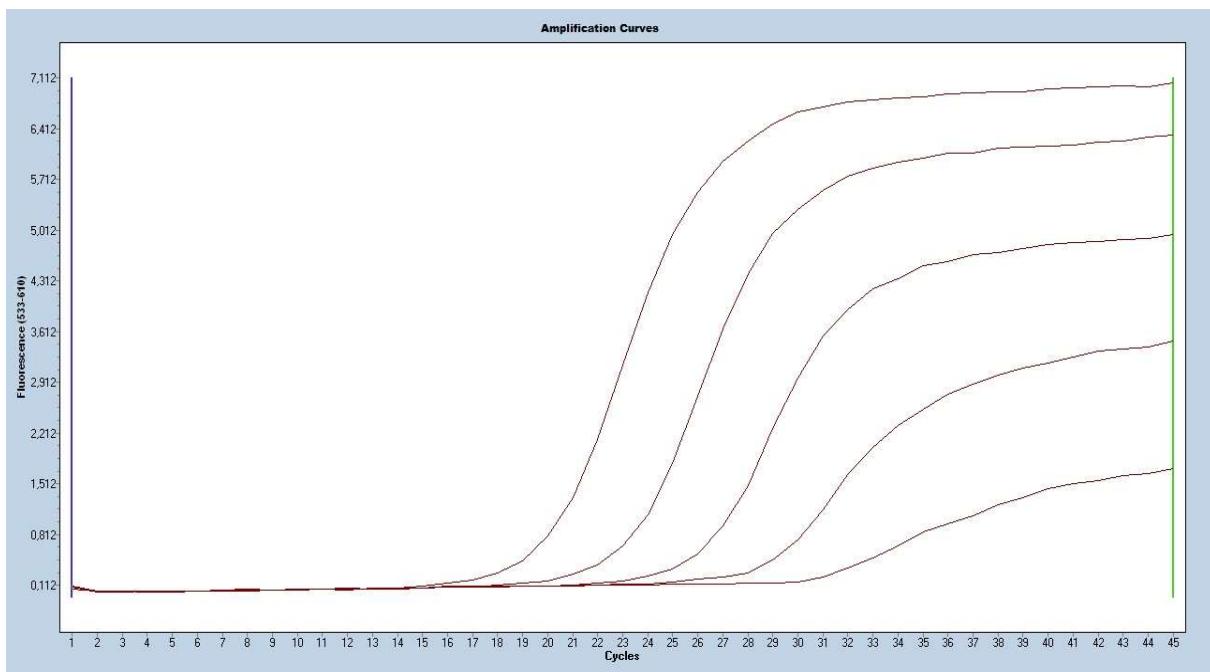
### 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE CAP Bac real-time multiplex PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 50$  DNA-Kopien / Reaktion für *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae*.

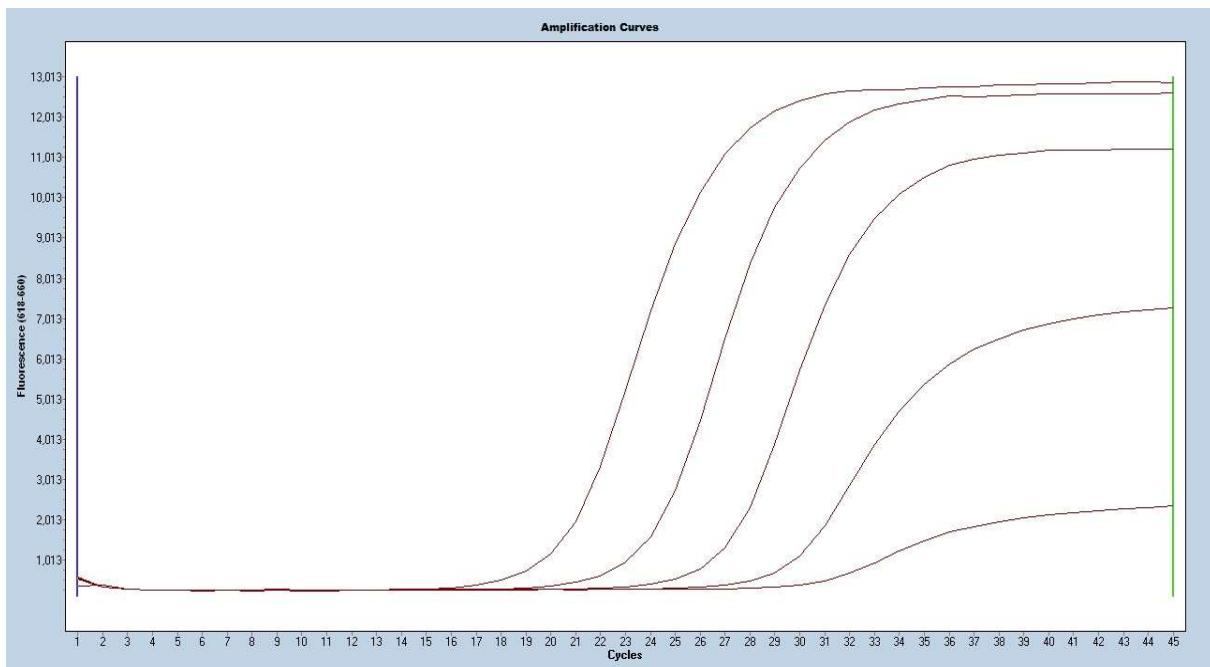
Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Verdünnungsreihen von *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae* (jeweils  $5 \times 10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/Reaktion) auf dem LightCycler® 480II.



**Abb. 4:** Verdünnungsreihe *Chlamydophila pneumoniae*  
( $5 \times 10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien /Reaktion) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 5:** Verdünnungsreihe *Legionella pneumophila* ( $5 \times 10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien /Reaktion) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe *Mycoplasma pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien /Reaktion) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, DNA-Extraktion und DNA-Gehalt.

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE CAP Bac multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae*. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

**Tab. 15:** Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	Echovirus 11	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Parainfluenza virus serotype 3	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	Enterovirus Typ 71	-	<i>Legionella bozemani</i>	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Legionella longbeacheae</i>	-	Respiratory syncitial virus, human, strain 9320	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Herpes simplex virus 1, strain McIntyre	-	<i>Mycoplasma fermentas</i>	-	Respiratory syncitial virus, human, strain Long	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	Herpes simplex virus 2, strain MS	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Rhinovirus, genogroup A, human	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Human Metapneumovirus	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
Coronavirus 229E, human	-	Influenza virus, infectious A/PR/8/34	-	Parainfluenza virus 1, human strain C35	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
Coxsackie B4, human	-	Influenza B (B/Lee/40)	-	Parainfluenza virus 2, human, strain Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-

### **13.4 Analytische Reaktivität**

Die Reaktivität des RIDA®GENE CAP Bac multiplex real-time PCR Tests wurde mit *Legionella pneumophila*-Serogruppen untersucht (s. Tab. 13). Die getesteten *Legionella pneumophila*-Serogruppen wurden mit dem RIDA®GENE CAP Bac multiplex real-time PCR Test nachgewiesen.

**Tab. 16:** Analytische Reaktivitätstestung

<b><i>Legionella pneumophila</i></b>					
Serogruppe 1	+	Serogruppe 6	+	Serogruppe 11	+
Serogruppe 2	+	Serogruppe 7	+	Serogruppe 12	+
Serogruppe 3	+	Serogruppe 8	+	Serogruppe 13	+
Serogruppe 4	+	Serogruppe 9	+	Serogruppe 14	+
Serogruppe 5	+	Serogruppe 10			

### **14. Versionsübersicht**

<b>Versionsnummer</b>	<b>Kapitel und Bezeichnung</b>
2019-09-10	Freigabeversion

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstellldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

**Reaction Mix**

**Taq-Polymerase**

**Internal Control DNA**

**No Template Control**

**Positive Control**

## 16. Literatur

1. Höffken *et al.* [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. Pneumologie. 2009; 63:e1-68.
2. Ramirez *et al.* Changing needs of community-acquired pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011. 66 Suppl 3:iii3-9.
3. 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.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Mycoplasma pneumoniae* Infections. 2018.

- <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>. Accessed: 14.08.2019.
5. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Chlamydiosen (Teil 2): Erkrankungen durch Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae und Simkania negevensis. 2010. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Chlamydiosen\\_Teil2.html#doc2382910bodyText15](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil2.html#doc2382910bodyText15). Accessed: 15.08.2019
  6. Sharma L. *et al.* Atypical Pneumonia: Updates on Legionella, Chlamydophila, and Mycoplasma Pneumonia. Clin Chest Med. 2017. 38 (1):45-58.
  7. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
  8. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Legionellose. 2019. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Legionellose.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Legionellose.html). Accessed: 01.10.2019
  9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.

## **English**

# **RIDA®GENE CAP Bac**

**REF** PG2705

### **1. Intended use**

For *in vitro* diagnostic use. RIDA®GENE CAP Bac is a multiplex real-time PCR for the direct qualitative detection and differentiation of *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Legionella pneumophila*, and *Mycoplasma pneumoniae* in human bronchoalveolar lavage (BAL).

The RIDA®GENE CAP Bac multiplex real-time PCR is intended to use as an aid in diagnosis for community-acquired pneumonia (CAP) caused by *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, or *Mycoplasma pneumoniae*.

### **2. Summary and explanation of the test**

Community-acquired pneumonia (CAP) is the most frequently recorded infectious disease worldwide and is the infectious disease which most frequently leads to death in Western nations. In Germany, there are up to 600,000 cases of CAP annually, and the mortality varies between 0.6 % and 14 % depending on whether CAP is outpatient or inpatient.<sup>1</sup> Bacteria are the most frequent pathogens of CAP, and a distinction is drawn between typical and atypical pathogens. Atypical bacteria cannot be cultivated in a regular culture of sputum or blood and also cannot be visualized by gram staining. This makes it difficult to detect atypical CAP bacteria since standard methods generally make identification impossible. The most frequent atypical CAP bacteria include *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Legionella* spp., and *Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*).<sup>2</sup>

Up to 20 % of outpatient pneumonias are triggered by *M. pneumoniae*.<sup>3</sup> *M. pneumoniae* is a highly infectious bacterium without a cell wall that is primarily transmitted in the air through droplets or by direct or indirect contact through smear infections. *M. pneumoniae* does not belong to the normal flora of humans and is generally detected in children and young adults. Pneumonia develops in 5 % to 25 % of cases of infection with *M. pneumoniae* and generally requires further treatment with antibiotics.<sup>4</sup>

*Chlamydophila pneumoniae* is a gram-negative bacteria and is generally transmitted through the air.<sup>5</sup> An infection with *C. pneumoniae* is generally difficult to overcome, but mild.<sup>5,6</sup> It is estimated that *C. pneumoniae* has a prevalence rate of 50 % to 70 %, and 60 % of the population will have experienced a *C. pneumoniae* infection by the age of 20. A severe case can lead to atypical pneumonia. In Germany, it is estimated

that up to 5 % of CAP pneumonias are caused by *C. pneumoniae*.<sup>1,5</sup> The bacteria can dwell in the upper respiratory tract for many years so the danger of infection may exist for a long time. Classic antigen detection methods such as ELISA have only a narrow specificity and can be used only after several weeks of an acute infection. PCR can detect the pathogen reliably from respiratory samples or tissues.<sup>5</sup> The *Legionella* strain belongs to the *Legionellaceae* family and is divided into 40 species with more than 70 serogroups. *Legionella* bacteria are facultative intracellular gram-negative bacteria whose peak infection rate occurs in summer and early fall. With Legionnaires' disease, a differentiation is made between community

acquired, travel-associated, and nosocomial infections. In the USA, the mortality rate of nosocomial infections is between 15 % and 20 %. In Europe, 12 % of all *Legionella* infections are fatal.<sup>7</sup> All *Legionella* species are to be considered potentially pathogenic to humans. In Europe, however, most community-acquired illnesses are caused by pathogens of the species *Legionella pneumophila* serogroup 1. An infection with *Legionella pneumophila* primarily leads to Legionnaires' disease (also termed legionellosis).<sup>8</sup>

### 3. Test principle

RIDA®GENE CAP Bac is a multiplex real-time PCR for the direct qualitative detection of *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Mycoplasma pneumoniae* in human bronchoalveolar lavage (BAL).

Following DNA isolation, the specific gene fragments (if present) of *Chlamydophila pneumoniae* (16S-rRNA), *Legionella pneumophila* (16S-rRNA), and *Mycoplasma pneumoniae* (IGS) are amplified. The amplified target sequences are detected using hydrolysis probes that are attached to a quencher at one end and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other end. The probes hybridize with the amplicons in the presence of a target sequence. During extension, the **Taq-Polymerase** separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescence signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR device. The fluorescence signal increases with the quantity of formed amplicons. The RIDA®GENE CAP Bac test contains an **Internal Control DNA** (ICD) to be able to control the specimen preparation and/or potential PCR inhibition.

#### 4. Reagents provided

**Table 1:** Reagents provided (The reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations.)

Kit code	Reagents	Amount	Lid color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl
N	No Template Control	1x	450 µl
P	Positive Control	1x	200 µl

#### 5. Storage instructions

- All reagents must be stored away from light at -20 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 – 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 20 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents during PCR preparation (2 – 8 °C).

## 6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac multiplex real-time PCR test can be used with the following extraction platforms and real-time PCR devices:

**Table 2:** Necessary equipment

Extraction platforms	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Real-time PCR devices	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> CYCLER
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480II, LightCycler <sup>®</sup> 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Note: When using Rotor-Gene Q (QIAGEN), use only 0.1 ml reaction vials.**

Should you have to use other extraction procedures or real-time PCR devices, please contact R-Biopharm to check the compatibility at [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) when using LightCycler<sup>®</sup> 480II and LightCycler<sup>®</sup> 480 z
- Real-time PCR consumables (plates, reaction vials, films)
- Centrifuge with rotor for reaction vials or plates
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipette tips with filters
- Powder-free disposable gloves
- PCR water (nuclease-free)

## 7. Precautions for users

For *in vitro* diagnostic use only.

### 7.1 General warnings and precautions for the users

This test must be carried out only by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be followed. Read through the instructions for use carefully prior to testing and strictly adhere to the instructions.

Biological specimens must be viewed as potentially infectious and must be handled and disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact

with potentially infectious specimens. Avoid direct contact with biological specimens. Avoid squirting or spraying. Materials that come into contact with biological specimens must be disposed of at least in accordance with applicable regulations. Flammable disposable materials must be burned. Liquid waste containing acids or bases must be neutralized prior to disposal.

Users are responsible for proper disposal of all reagents and materials after use in accordance with appropriate safety standards. For disposal, please adhere to national regulations.

For further details, see the safety data sheets (SDS) at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses, face mask) when handling reagents and specimens, and wash hands meticulously after completing the test. Do not pipette samples or reagents using your mouth. Do not smoke, eat, drink, or use cosmetic products in work areas. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.

Dispose of test kit once the expiration date has lapsed. Use only the reagents provided with the product and recommended by the manufacturer. Do not use reagents from other lots. Do not use reagents from other manufacturers.

## **7.2 Molecular biological warnings and precautions for the users**

Molecular biological procedures such as nucleic acid extraction, amplification, and detection require trained and qualified laboratory personnel to avoid the risk of erroneous results, especially resulting from the degradation of the nucleic acid in the specimens or contamination of the specimens with amplification products.

For manual processing, ensure that sample preparation/extraction, PCR preparation, and PCR are carried out in different rooms in order to avoid cross-contamination. Never bring amplification products into areas where sample preparation/extraction and PCR preparation are taking place. Each area (sample preparation/extraction, PCR preparation, and PCR) requires separate lab coats, gloves, and implements designated exclusively for that area. Lab coats, gloves, and implements from the PCR area should never be used in the sample preparation/extraction or PCR preparation area.

The specimens should be used only for this type of analysis and must be processed under the biosafety cabinet. Never open vials of different specimens at the same time. Pipettes used for sample preparation must be used for this purpose only.

The required reagents must be processed under a laminar flow workbench. The reagents needed for amplification must be prepared for use in a test procedure.

Pipettes used for reagents must be used for this purpose only. Only positive displacement pipettes or pipettes with filter tips may be used. The pipette tips must be sterile and free of DNase and RNase as well as DNA and RNA.

To avoid contamination, handle amplification products such that their spread into the environment is avoided as much as possible. Pipettes used for amplification products must be used only for this purpose.

## **8. Collection and storage of specimens**

### **8.1 DNA preparation from bronchoalveolar lavage (BAL)**

For DNA isolation from BAL, specimens must be used that were stored according to laboratory guidelines, but not stored or transported for longer than 24 hours after being taken. Specimens that were transported and/or stored for more than 24 hours should be stored for up to 72 hours at +2 °C to +8 °C. Specimens stored for longer than 72 hours must be kept at -70 °C.<sup>9</sup>

It is recommended to produce aliquots of the specimens to avoid repeated thawing and freezing. Frozen specimens should be thawed immediately prior to extraction to prevent degradation of the nucleic acid.

A commercially obtainable nucleic acid extraction kit (such as RIDA® Xtract (R-Biopharm)) or nucleic acid extraction system (such as Maxwell® RSC (Promega)) is recommended for DNA preparation from bronchoalveolar lavage (BAL). The manufacturer's instructions must be observed.

The RIDA®GENE CAP Bac test contains an **Internal Control DNA** which indicates potential PCR inhibition, checks the integrity of the reagents, and confirms successful nucleic acid extraction. The **Internal Control DNA** can be used either only as inhibition control or as extraction control for specimen preparation and as inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** must be added to the master mix (see Table 4).

If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for specimen preparation **and** as inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** must be used during extraction. The **Internal Control DNA** should be added to the specimen-lysis buffer mix and should **not** be added directly to the specimen material. We recommend pipetting 1 µl per reaction of the

**Internal Control DNA** to both the PCR mix for the negative control and the positive control.

## **9. Test procedure**

### **9.1 Master-Mix preparation**

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. One positive and one negative control must be included in each test run.

Adding an additional 10 % volume to the master mix is recommended in order to balance out the pipette loss (see Tab. 3, Tab. 4). Prior to use, thaw, mix, and briefly

centrifuge the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control**, and the **Internal Control DNA**. Always cool all reagents during work steps (2 – 8 °C).

**Table 3:** Example of the calculation and production of the master mix for 10 reactions (ICD extraction and inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µl	212.3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0.7 µl	7.7 µl
	<b>Overall</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

**Table 4:** Example of the calculation and production of the master mix for 10 reactions (ICD only as inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µl	212.3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0.7 µl	7.7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	1.0 µl	11 µl
	<b>Overall</b>	<b>21.0 µl</b>	<b>231.0 µl</b>

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

## 9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the master mix into each reaction vial (vial/plate).

**Negative control:** Pipette 5 µl of the **No Template Control** to the pre-pipetted master mix.

**Note:** We recommend pipetting 1 µl of the **Internal Control DNA** into the PCR mix for the negative control when using the **Internal Control DNA** as extraction control for specimen preparation and as inhibition control.

**Specimens:** Pipette 5 µl eluate to the pre-pipetted master mix.

**Positive control:** Pipette 5 µl of the **Positive Control** to the pre-pipetted master mix.

**Note:** We recommend pipetting 1 µl of the **Internal Control DNA** into the PCR mix for the positive control when using the **Internal Control DNA** as extraction control for specimen preparation and as inhibition control.

Seal the reaction vials or plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer into the real-time PCR device. Start PCR according to device settings (see Table 5, Table 6, Table 7, Table 8).

## 9.3 PCR instrument set-up

### 9.3.1 DNA real-time PCR profile

**Table 5:** DNA real-time PCR profile for LightCycler® series Rotor-Gene Q, RIDA®CYCLER

Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum

**Note:** Annealing and extension take place in the same step.

**Table 6:** DNA real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, and CFX96™

Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum

**Note:** Annealing and extension take place in the same step.

### 9.3.2 Universal real-time PCR profile

**Note:** The universal real-time PCR profile for DNA tests should be used only if RIDA®GENE DNA and RIDA®GENE RNA real-time PCR tests are combined in one run.

**Table 7:** Universal real-time PCR Profile for LightCycler® series and RIDA®CYCLER

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum

**Note:** Annealing and extension take place in the same step.

**Table 8:** Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q, and CFX96™

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum

**Note:** Annealing and extension take place in the same step.

## 9.4 Detection channel setting

**Table 9:** Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Comment
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Green	-
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Red	
Roche LightCycler® 480II	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.</b>
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	533/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.</b>
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	610/670	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	<b>Set the reference dye to none.</b>
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	<b>Set the passive reference dye ROX to none.</b>
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Green	<b>The gain settings must be set to 5 (default) for all channels.</b>
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Red	

## 10. Quality control

Specimens are evaluated using the analysis software of the respective real-time PCR device according to the manufacturer's instructions. The negative control and positive control must show the correct results (see Table 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

The **Positive Control** comes at a concentration of  $10^3$  copies/ $\mu\text{l}$ . It is used in a total quantity of  $5 \times 10^3$  copies in every PCR run.

**Table 10:** A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	Result	ICD Ct	Target gene Ct
Positive control	Positive	N/A *1	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

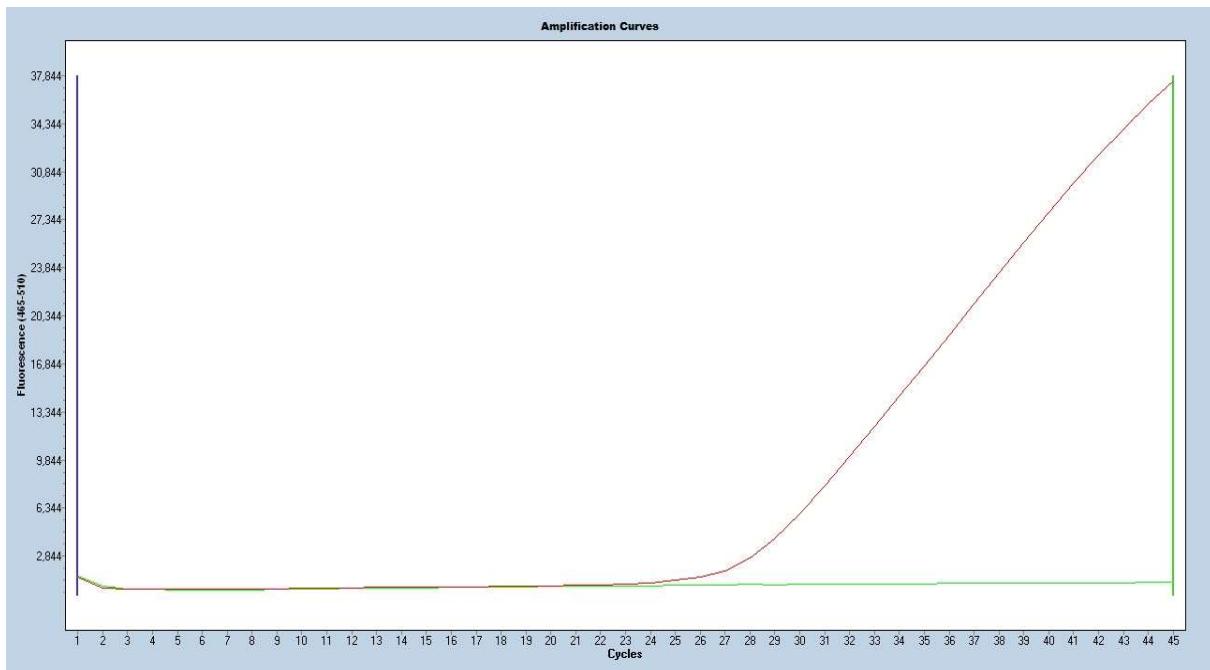
\*1 A Ct value for the ICD is not essential to achieve a positive result for the positive control.

If the positive control is not in the specified Ct range but the negative control is valid, all reactions need to be reanalyzed, including the controls.

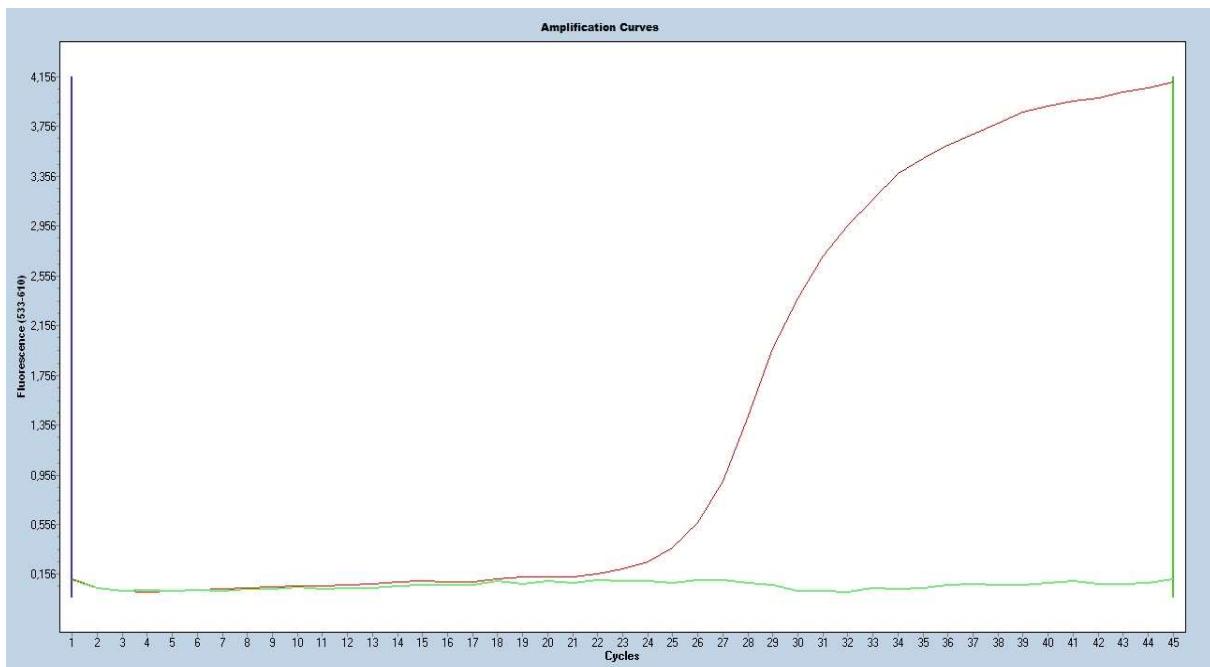
If the negative control is not negative but the positive control is valid, all reactions need to be reanalyzed, including the controls.

If the specified values are not met, check the following things before repeating the test:

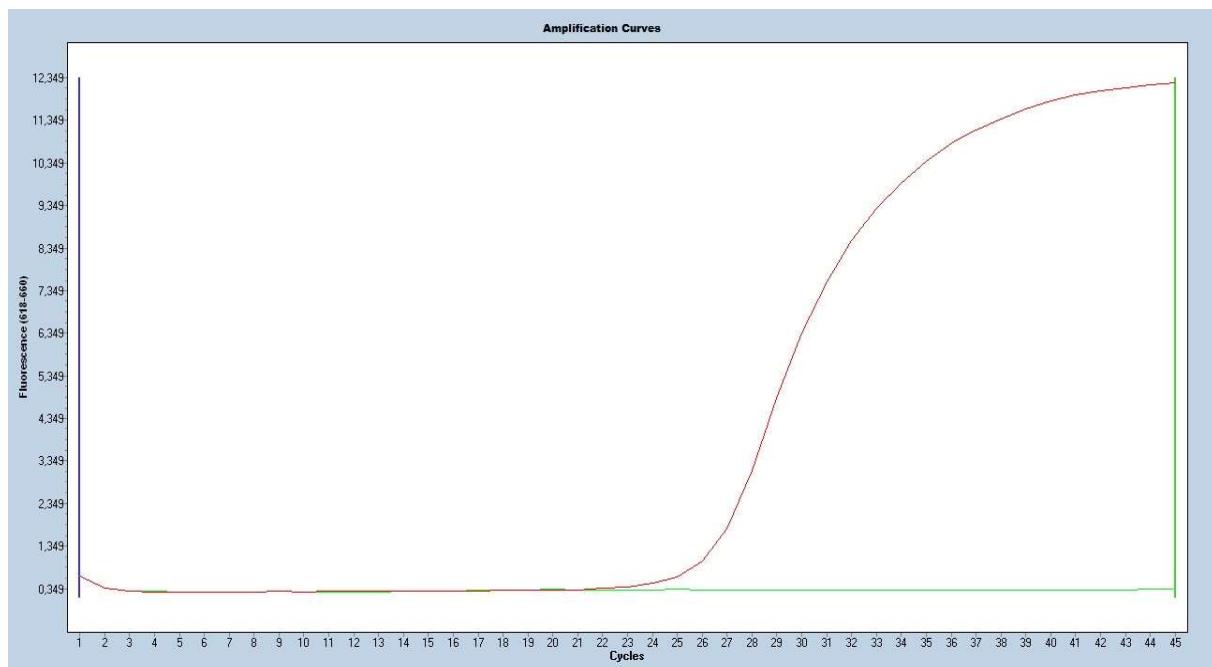
- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the devices used
- Correct test procedure



**Fig. 1:** Correct run of the positive control (red) and negative control (green) (*Chlamydophila pneumoniae*) on LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Correct run of the positive control (red) and negative control (green) (*Legionella pneumophila*) on LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Correct run of the positive control (red) and negative control (green) (*Mycoplasma pneumoniae*) on LightCycler® 480II

## 11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 11.

**Table 11:** Sample interpretation

Detection of				
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Result
positive	negative	negative	positive / negative	<i>C. pneumoniae</i> detectable
negative	<b>positive</b>	negative	positive / negative	<i>L. pneumophila</i> detectable
negative	negative	<b>positive</b>	positive / negative	<i>M. pneumoniae</i> detectable
<b>positive</b>	<b>positive</b>	negative	positive / negative	<i>C. pneumoniae</i> and <i>L. pneumophila</i> detectable
positive	negative	<b>positive</b>	positive / negative	<i>C. pneumoniae</i> and <i>M. pneumoniae</i> detectable
negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	positive / negative	<i>L. pneumophila</i> and <i>M. pneumoniae</i> detectable
<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	positive / negative	<i>C. pneumoniae</i> , <i>L. pneumophila</i> , and <i>M. pneumoniae</i> detectable
negative	negative	negative	positive	Target genes not detectable
negative	negative	negative	negative	Invalid

A specimen is rated positive if the specimen DNA and the **Internal Control DNA** show an amplification signal in the detection system.

A specimen is also rated positive if the specimen DNA displays an amplification signal but no amplification signal can be found in the detection system for the **Internal Control DNA**. Detecting the **Internal Control DNA** is not necessary in this case because high amplicon concentrations can cause a weak or absent signal of the **Internal Control DNA**.

A specimen is rated negative if the specimen DNA does not show an amplification signal, but an amplification signal for the **Internal Control DNA** can be found in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be ruled out by the detection of the **Internal Control DNA**.

A specimen is invalid if the specimen DNA and the **Internal Control DNA** do not show an amplification signal in the detection system. There are PCR inhibitors in the sample, or an error occurred during the extraction process. The extracted specimen should be diluted 1:10 with PCR water and re-amplified, or the isolation and purification of the specimen should be improved

## **12. Limitations of the method**

1. The diagnosis should not be based on the result of the molecular biological test alone, but should always take the patient's medical history and symptoms into account.
2. This test is only valid for bronchoalveolar lavage (BAL).
3. The presence of PCR inhibitors can lead to non-evaluable results.
4. The results obtained with this product depend on adequate specimen identification, extraction, transport, storage, and handling. It is therefore critical to perform these steps carefully and follow the instructions provided by the manufacturer of the nucleic acid extraction products. Improper specimen sampling, transport, storage, and handling or a pathogen load below the test's analytical sensitivity can lead to false negative results.
5. Use of this product requires work clothing and work areas that are suitable for handling potentially infectious biological specimens and chemical preparations classified as hazardous in order to prevent accidents involving possible serious consequences for the user and other individuals.
6. This product may be used only by qualified personnel trained in performing molecular biological procedures such as extraction, amplification, and detection of nucleic acids. This requirement should prevent false results.
7. For manual processing, ensure that sample preparation/extraction, PCR preparation, and PCR are carried out in different rooms in order to prevent false-positive results.
8. For manual processing, separate clothing and instruments are required for sample preparation/extraction, PCR preparation, and PCR in order to prevent false-positive results during the use of this product.
9. As with all PCR-based *in vitro* diagnostic tests, extremely low concentrations of the target sequences under the limit of detection (LoD) can be detected. The results obtained are not always reproducible.
10. Mutations or polymorphisms in the primer or probe binding sites can interfere with the detection of new or unknown variants and can lead to false-negative results using RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac.
11. As with all PCR-based *in vitro* diagnostic tests, extremely low concentrations of the target sequences under the limit of detection (LoD) can be detected. The results obtained are not always reproducible.
12. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. A positive result indicates that the target genes (*Chlamydophila pneumoniae* (16S-rRNA), *Legionella pneumophila* (16S-rRNA), and *Mycoplasma pneumoniae* (IGS)) are present.
13. The substances paracodeine, ciprofloxacin, and guaifenesin/dextromethorphan can manifest interfering properties even in small amounts.

## 13. Performance characteristics

### 13.1 Clinical performance

The RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac multiplex real-time PCR was compared in an external laboratory with the pathogen-specific real-time PCR test method of the laboratory (analogous to PCR test methods accredited according to DIN EN ISO 15189:2007) using LightCycler<sup>®</sup> 480 II and LightCycler<sup>®</sup> 2.0. Overall, 282 retention samples of nucleic acid extracts from respiratory clinical test material (BAL) were tested. An invalid result was detectable in 17 samples (6 %) due to the negative detection of the internal control DNA, which indicates a sensitive detection of inhibitor results on the part of the RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac assay. These specimens were not included in the evaluation.

The results of the individual pathogens are shown in Tables 12 to 14:

**Table 12:** Detection of *Chlamydia pneumoniae* (CP)

		RIDA <sup>®</sup> GENE CAP Bac – <i>C. pneumoniae</i>		Overall
In-house CP	Positive	Positive	Negative	
	Positive	30	0	30
	Negative	0	235	235
Overall		30	235	265

Sensitivity	100.0 %
Specificity	100.0 %
PPV	100.0 %
NPV	100.0 %

**Table 13:** Detection of *Mycoplasma pneumoniae* (MP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>M. pneumoniae</i>		Overall
In-house MP	Positive	Positive	Negative	
	Negative	0	215	215
	Overall	50	215	265

Sensitivity	100.0 %
Specificity	100.0 %
PPV	100.0 %
NPV	100.0 %

**Table 14:** Detection of *Legionella pneumophila* (LP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>L. pneumophila</i>		Overall
In-house LP	Positive	Positive	Negative	
	Negative	5	210	215
	Overall	55	210	265

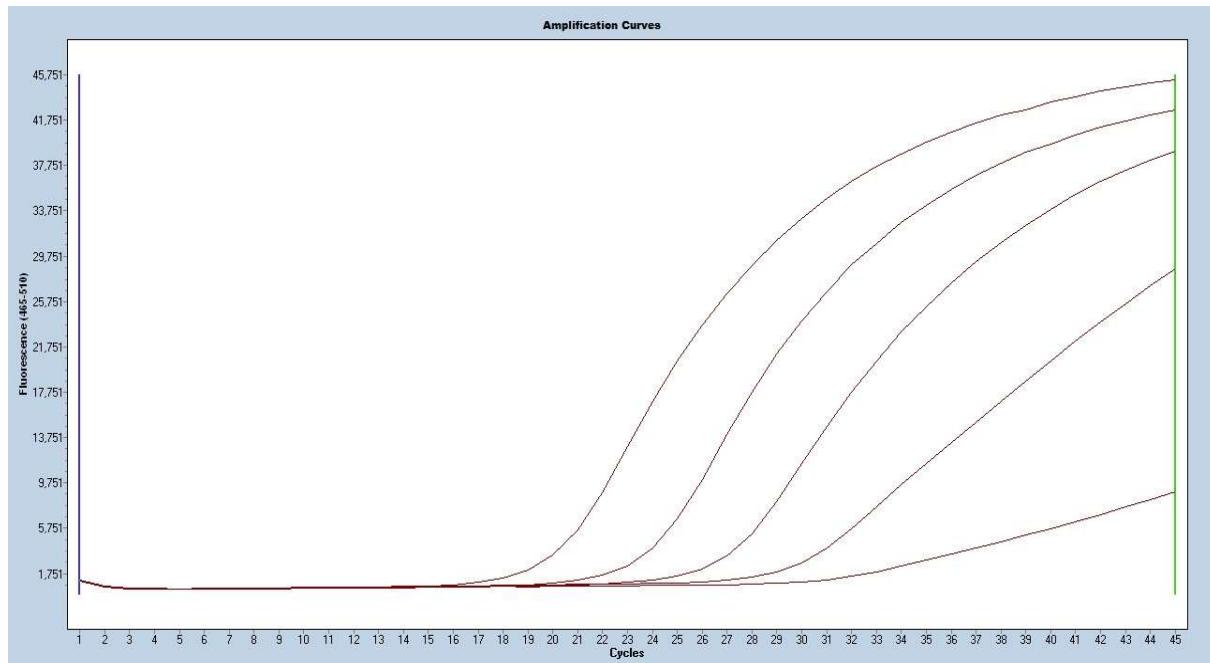
  

Sensitivity	100.0 %
Specificity	97.7 %
PPV	90.9 %
NPV	100.0 %

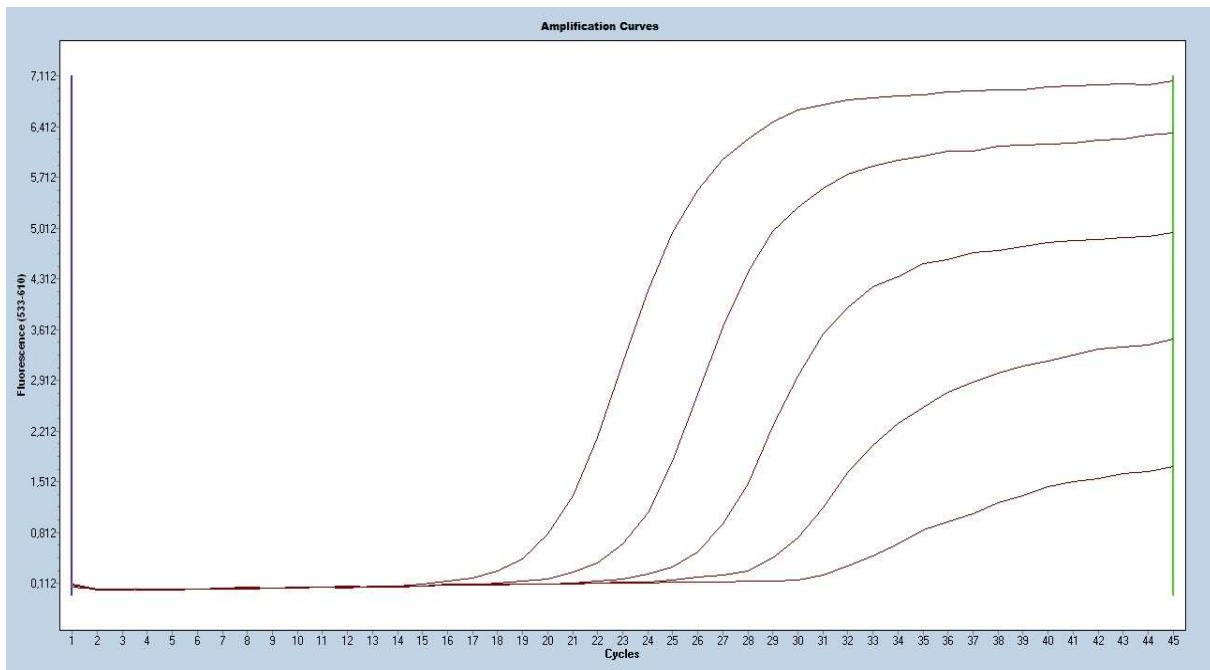
## 13.2 Analytical sensitivity

The RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac real-time multiplex PCR has a detection limit of  $\geq 50$  DNA copies per reaction for *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Mycoplasma pneumoniae*.

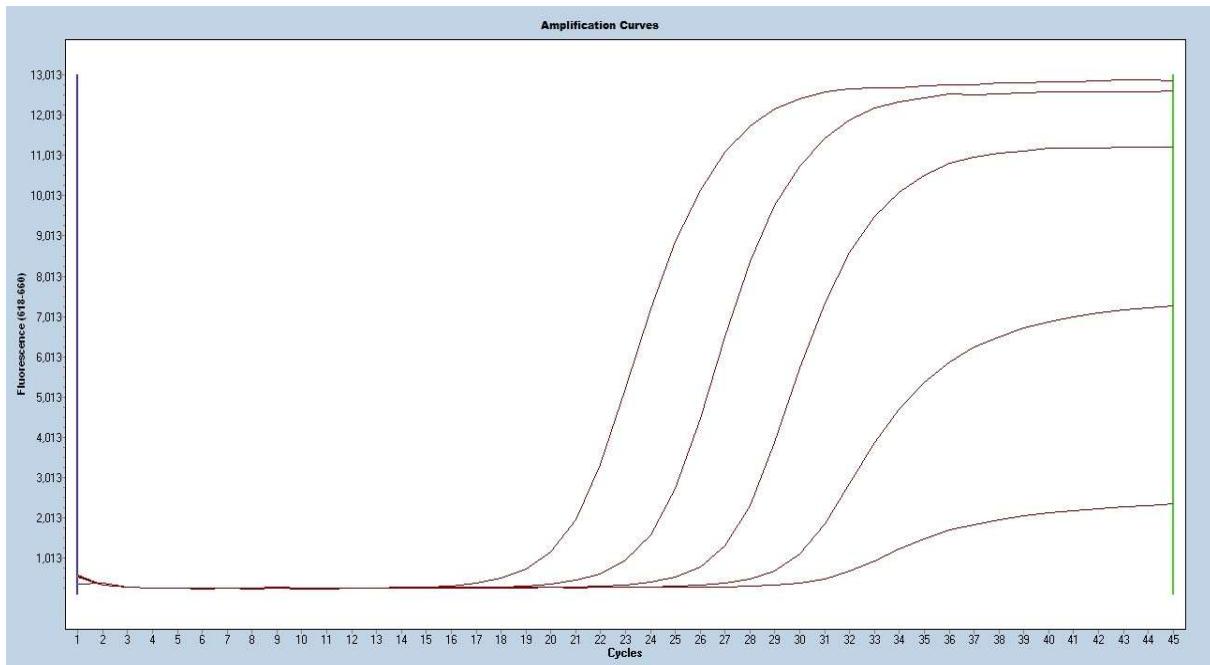
Figures 4, 5, and 6 below show dilution series of *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Mycoplasma pneumoniae* (each  $5 \times 10^5$  to  $10^1$  DNA copies/reaction) on LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Fig. 4:** Dilution series of *Chlamydophila pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  to  $10^1$  DNA copies/reaction) on LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 5:** Dilution series of *Legionella pneumophila* ( $5 \times 10^5$  to  $10^1$  DNA copies/reaction) on LightCycler® 480II



**Fig. 6:** Dilution series of *Mycoplasma pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  to  $10^1$  DNA copies/reaction) on LightCycler® 480II

The limit of detection of the overall process depends on the specimen matrix, the DNA extraction, and the DNA content.

### 13.3 Analytical specificity

The RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac multiplex real-time PCR is specific to *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Mycoplasma pneumoniae*. No cross-reactivities with the following species were detected (see Table 12):

**Table 15:** Cross-reactivity testing

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	Echovirus 11	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Parainfluenza virus serotype 3	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	Enterovirus type 71	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Herpes simplex virus 1, strain McIntyre	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	Herpes simplex virus 2, strain MS	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Rhinovirus, genogroup A, human	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Human metapneumovirus	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
Coronavirus 229E, human	-	Influenza virus, infectious A/PR/8/34	-	Parainfluenza virus 1, human strain C35	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
Coxsackie B4, human	-	Influenza B (B/Lee/40)	-	Parainfluenza virus 2, human, strain Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-

### 13.4 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac multiplex real-time PCR test was investigated using *Legionella pneumophila* serogroups (see Table 13). The tested *Legionella pneumophila* serogroups were detected using the RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac multiplex real-time PCR test.

**Table 16:** Analytical reactivity testing

Legionella pneumophila					
Serogroup 1	+	Serogroup 6	+	Serogroup 11	+
Serogroup 2	+	Serogroup 7	+	Serogroup 12	+
Serogroup 3	+	Serogroup 8	+	Serogroup 13	+
Serogroup 4	+	Serogroup 9	+	Serogroup 14	+
Serogroup 5	+	Serogroup 10			

### 14. Version history

Version number	Chapter and designation
2019-09-10	Release version

### 15. Explanation of symbols

#### General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

## Test-specific symbols

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Literature

1. Höffken *et al.* [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. Pneumologie. 2009; 63:e1-68.
2. Ramirez *et al.* Changing needs of community-acquired pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011. 66 Suppl 3:iii3-9.
3. 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.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Mycoplasma pneumoniae* Infections. 2018.  
<https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>. Accessed: 14.08.2019.
5. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Chlamydiosen (Teil 2): Erkrankungen durch Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae und Simkania negevensis. 2010. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Chlamydiosen\\_Teil2.html#doc2382910bodyText15](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil2.html#doc2382910bodyText15). Accessed: 15.08.2019
6. Sharma L. *et al.* Atypical Pneumonia: Updates on Legionella, Chlamydophila, and Mycoplasma Pneumonia. Clin Chest Med. 2017. 38 (1):45-58.
7. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
8. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Legionellose. 2019.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Legionellos\\_e.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Legionellos_e.html). Accessed: 01.10.2019
9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for

Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.



## **RIDA®GENE CAP Bac**

**REF**

**PG2705**

### **1. Uso previsto**

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE CAP Bac es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y la diferenciación de *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humano.

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE CAP Bac está concebido como una ayuda para el diagnóstico de la neumonía contraída en la comunidad (NCC) causada por *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* o *Mycoplasma pneumoniae*.

### **2. Resumen y descripción del ensayo**

La neumonía contraída en la comunidad (NCC) es la enfermedad infecciosa registrada con más frecuencia en todo el mundo y es la que con más frecuencia conduce a la muerte en los países occidentales. En Alemania ocurren anualmente hasta 600 000 casos de NCC y la mortalidad varía entre el 0,6 % y el 14 %, según si la NCC es ambulatoria u hospitalaria.<sup>1</sup> Las bacterias son los patógenos más frecuentes de la NCC, y se distingue entre patógenos típicos y atípicos. Las bacterias atípicas no se pueden cultivar en un cultivo regular de esputo o sangre y tampoco pueden visualizarse mediante tinción de Gram. Esto dificulta la detección de bacterias de NCC atípicas, ya que los métodos estándar por lo general hacen que la identificación sea imposible. Entre las bacterias de NCC atípicas más frecuentes se encuentran *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Legionella* spp. y *Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*).<sup>2</sup>

*M. pneumoniae* es causante de hasta el 20 % de los casos ambulatorios de neumonía.<sup>3</sup> *M. pneumoniae* es una bacteria altamente infecciosa sin pared celular que se transmite principalmente a través del aire mediante gotas o por contacto directo o indirecto con infecciones en frotis. *M. pneumoniae* no forma parte de la microbiota normal humana, y se detecta generalmente en los niños y adultos jóvenes. En el 5 % al 25 % de los casos de infección con *M. pneumoniae* se desarrolla neumonía, que generalmente requiere tratamiento adicional con antibióticos.<sup>4</sup>

*Chlamydophila pneumoniae* es una bacteria gramnegativa que por lo general se transmite a través del aire.<sup>5</sup> Una infección con *C. pneumoniae* suele ser difícil de

superar, pero es leve.<sup>5,6</sup> Se estima que *C. pneumoniae* tiene una tasa de prevalencia de 50 % a 70 %, y el 60 % de la población habrá padecido una infección con *C. pneumoniae* hacia los 20 años de edad. Un caso grave puede dar lugar a la neumonía atípica. En Alemania, se calcula que hasta el 5 % de las neumonías NCC son causadas por *C. pneumoniae*.<sup>1,5</sup> La bacteria puede habitar en las vías respiratorias superiores durante varios años, así que el peligro de infección puede existir durante largo tiempo. Los métodos clásicos de detección por antígenos, como ELISA, tienen una especificidad estrecha y pueden usarse solo después de varias semanas de una infección aguda. La PCR puede detectar el patógeno de manera confiable a partir de muestras de las vías respiratorias o de tejidos.<sup>5</sup>

El género *Legionella* pertenece a la familia *Legionellaceae* y cuenta con 40 especies y más de 70 serogrupos. La *Legionella* es una bacteria gramnegativa, intracelular facultativa, cuya máxima tasa de infecciones se produce durante el verano y principios del otoño. En el caso de la enfermedad del legionario, se ha hecho una distinción entre las infecciones adquiridas en la comunidad debido a viajes y las infecciones nosocomiales. En EE. UU., la tasa de mortalidad por infecciones nosocomiales es de entre 15 % y 20 %. En Europa, el 12 % de todas las infecciones por *Legionella* son mortales.<sup>7</sup> Todas las especies de *Legionella* se deben considerar como potencialmente patógenas para los humanos. En Europa, no obstante, la mayoría de las enfermedades adquiridas en la comunidad son causadas por patógenos del serogrupo 1 de la especie *Legionella pneumophila*. Una infección por *Legionella pneumophila* lleva principalmente a la enfermedad del legionario (también llamada legionellosis).<sup>8</sup>

### 3. Principio del ensayo

RIDA®GENE CAP Bac es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa de *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humano. Después de aislar el ADN, se amplifican los fragmentos génicos específicos (si están presentes) de *Chlamydophila pneumoniae* (ARNr 16S), *Legionella pneumophila* (ARNr 16S) y *Mycoplasma pneumoniae* (IGS). Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis unidas a un extintor de fluorescencia en un extremo y a un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. La sonda se hibrida con los amplicones en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq-Polymerase** separa al indicador del extintor. El reportero emite una señal de fluorescencia que es detectada por la unidad óptica de un dispositivo de PCR en tiempo real. La señal de fluorescencia aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE CAP Bac contiene un **Internal Control DNA** (ICD) para poder controlar la 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	Reactivos	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	Amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	Rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	Naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	Blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul

#### 5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a -20 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (por ejemplo, en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos durante la preparación de la PCR (2 - 8 °C).

## 6. Reactivos y equipo necesarios adicionales

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE CAP Bac puede usarse con las siguientes plataformas de extracción y dispositivos de PCR en tiempo real:

**Tabla 2:** Equipo necesario

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

**Nota: Al utilizar el Rotor-Gene Q (QIAGEN), use únicamente viales de reacción de 0,1 ml.**

Si necesita usar otros procedimientos de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm para comprobar la compatibilidad en [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- 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, viales de reacción, cubiertas de plástico)
- Centrífuga con rotor para placas o viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntas de pipeta con filtros
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

## **7. Precauciones para los usuarios**

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

### **7.1 Advertencias y precauciones generales para los usuarios**

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Lea las instrucciones de uso con atención antes de los análisis y cúmplalas estrictamente.

Las muestras biológicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben manejar y desechar adecuadamente, al igual que todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas. Evite el contacto directo con las muestras biológicas. Evite rociar o pulverizar. Los materiales que entren en contacto con las muestras biológicas deben eliminarse al menos de conformidad con las normativas correspondientes. Los materiales desechables inflamables deben quemarse. Los residuos líquidos que contengan ácidos o bases deben neutralizarse antes de desecharlos.

Los usuarios son responsables de desechar todos los reactivos y materiales usados de manera correcta y responsable de acuerdo con los estándares de seguridad apropiados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

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

Lleve equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, anteojos de protección, máscaras adecuados) al manipular los reactivos y las muestras, y lávese las manos meticulosamente después de finalizar el ensayo. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. No fume, coma, beba ni use productos cosméticos en las áreas de trabajo. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Deseche el kit de ensayo cuando alcance la fecha de caducidad. Use solo los reactivos suministrados con el producto y recomendados por el fabricante. No use reactivos de otros lotes. No use reactivos de otros fabricantes.

## **7.2 Advertencias y precauciones biológicas moleculares para los usuarios**

Los procedimientos biológicos moleculares tales como la extracción, amplificación y detección de ácido nucleico requieren personal de laboratorio capacitado y calificado para evitar el riesgo de resultados erróneos, en especial aquellos que surgen de la degradación del ácido nucleico en las muestras o de la contaminación de las muestras con productos de la amplificación.

Para el procesamiento manual, asegúrese de que la preparación/extracción de la muestra, la preparación de la PCR y la PCR se lleven a cabo en cuartos separados, con el fin de evitar la contaminación cruzada. No lleve nunca productos de la amplificación a áreas en las que se estén llevando a cabo la preparación/extracción de muestras y la preparación de la PCR. Cada área (preparación/extracción de la muestra, preparación de la PCR y PCR) requiere batas protectoras, guantes e implementos aparte diseñados exclusivamente para esa área. Las batas protectoras, los guantes y los implementos del área de la PCR no deben usarse nunca en el área de preparación/extracción o de preparación de la PCR.

Las muestras deben usarse solo para este tipo de análisis y deben procesarse en la cabina de bioseguridad. No abra viales de diferentes muestras al mismo tiempo. Las pipetas usadas para la preparación de la muestra deben usarse solo para este fin. Los reactivos requeridos deben procesarse en un banco de trabajo con flujo de aire laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben prepararse para ser usados en un procedimiento de prueba. Las pipetas usadas para los reactivos deben usarse solo para este fin. Deben usarse únicamente pipetas de desplazamiento positivo o pipetas con puntas con filtro. Las puntas de la pipeta deben ser estériles y estar libres de ADNasa y ARNasa así como de ADN y ARN.

Para evitar la contaminación, manipule los productos de amplificación de manera tal que se evite lo más posible su dispersión en el ambiente. Las pipetas usadas para productos de amplificación solo deben usarse para este fin.

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

### 8.1 Preparación del ADN de lavado broncoalveolar (LBA)

Para el aislamiento de ADN a partir de LBA se deben usar muestras almacenadas según los lineamientos del laboratorio, que no se hayan almacenado ni transportado durante más de 24 horas después de haber sido recolectadas. Las muestras que se transportaron o almacenaron durante más de 24 horas deben almacenarse durante hasta 72 horas a entre +2 °C y +8 °C. Las muestras almacenadas durante más de 72 horas deben mantenerse a -70 °C.<sup>9</sup>

Se recomienda preparar alícuotas de las muestras para evitar la descongelación y congelación repetidas. Las muestras congeladas deben descongelarse inmediatamente antes de la extracción para evitar la degradación del ácido nucleico.

Para la preparación de ADN a partir de lavado broncoalveolar (LBA), se recomienda un kit de extracción de ácidos nucleicos (como RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ácidos nucleicos (como Maxwell® RSC [Promega]) que puedan conseguirse en el mercado. Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE CAP Bac contiene un **Internal Control DNA** que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos. El **Internal Control DNA** puede usarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de extracción para la preparación de las muestras, y como control de inhibición.

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

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras **y** como control de inhibición, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante la extracción. El **Internal Control DNA** debe agregarse a la mezcla de muestra y báfer de lisado, y **no** directamente al material de muestra. Se recomienda agregar 1 µl por reacción del **Internal Control DNA** tanto a la mezcla para PCR de control negativo como a la de control positivo.

## 9. Ejecución de la prueba

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. En cada ensayo debe incluirse un control positivo y uno negativo.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Antes de usar, descongele, mezcle y centrifugue brevemente la Reaction Mix, la Taq-Polymerase, el Positive Control, el No Template Control, y el Internal Control DNA. Refrigere siempre todos los reactivos durante las etapas del trabajo (2 - 8 °C).

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

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
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 la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

**Tabla 4:** Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICD solo como control de inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
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 la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

## 9.2 Preparación de la mezcla de PCR

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

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

**Nota:** **Se recomienda agregar 1 µl del Internal Control DNA en la mezcla para PCR del control negativo al usar el Internal Control DNA como control de extracción para la preparación de muestras y como control de la inhibición.**

**Muestras:** Agregue 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

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

**Nota:** **Se recomienda agregar 1 µl del Internal Control DNA en la mezcla para PCR del control positivo al usar el Internal Control DNA como control de extracción para la preparación de muestras y como control de la inhibición.**

Selle los viales o placas de reacción, centrifugue brevemente y transfiera al dispositivo de PCR en tiempo real. Comience la PCR de acuerdo con los parámetros del dispositivo (consulte las tablas 5, 6, 7 y 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 Rotor-Gene Q de la serie LightCycler® y RIDA®CYCLER

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 pueden ocurrir en el mismo paso.

**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 pueden ocurrir en el mismo paso.

### 9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

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

**Tabla 7:** Perfil universal por PCR en tiempo real en los equipos LightCycler® y en el RIDA®CYCLER

<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 pueden ocurrir en el mismo paso.

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

<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 pueden ocurrir en el mismo paso.

## 9.4 Configuración del canal de detección

**Tabla 9:** Selección de los canales de detección adecuados

Dispositivo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Verde	-
	ICD	Amarillo	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Naranja	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rojo	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	533/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	618/660	
<b>Roche LightCycler® 480 z</b>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	610/670	
<b>Agilent Technologies Mx3005P</b>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Establezca el colorante de referencia en "none" (ninguno).
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en "none" (ninguno).
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Verde	La ganancia debe establecerse en 5 (de manera predeterminada) para todos los canales.
	ICD	Amarillo	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Naranja	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rojo	

## 10. Control de calidad

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real respectivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El control negativo y el control positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10 y las figuras 1, 2 y 3).

El **Positive Control** tiene una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu\text{l}$ . Se usa en una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias en cada corrida de PCR.

**Tabla 10:** Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICD	Ct de genes diana
Control positivo	Positivo	N/D *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

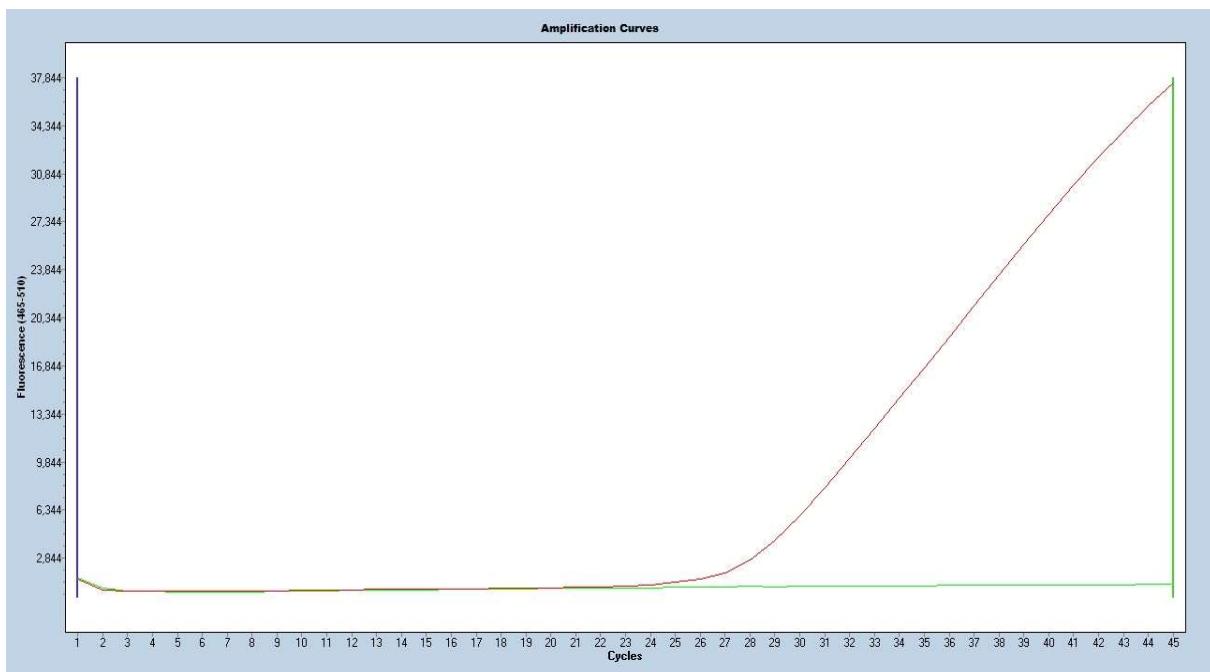
\*1 No es esencial tener un valor de Ct para el ICD para obtener un resultado positivo del control positivo.

Si el control positivo no se detecta en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, vuelva a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

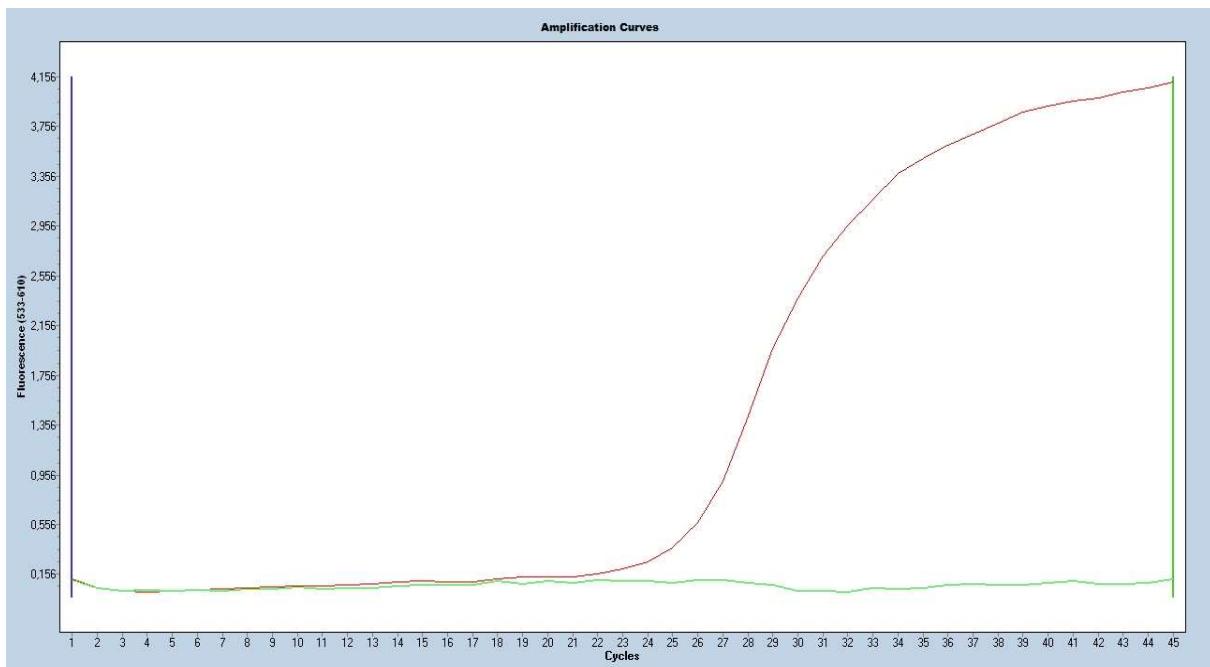
Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, vuelva a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

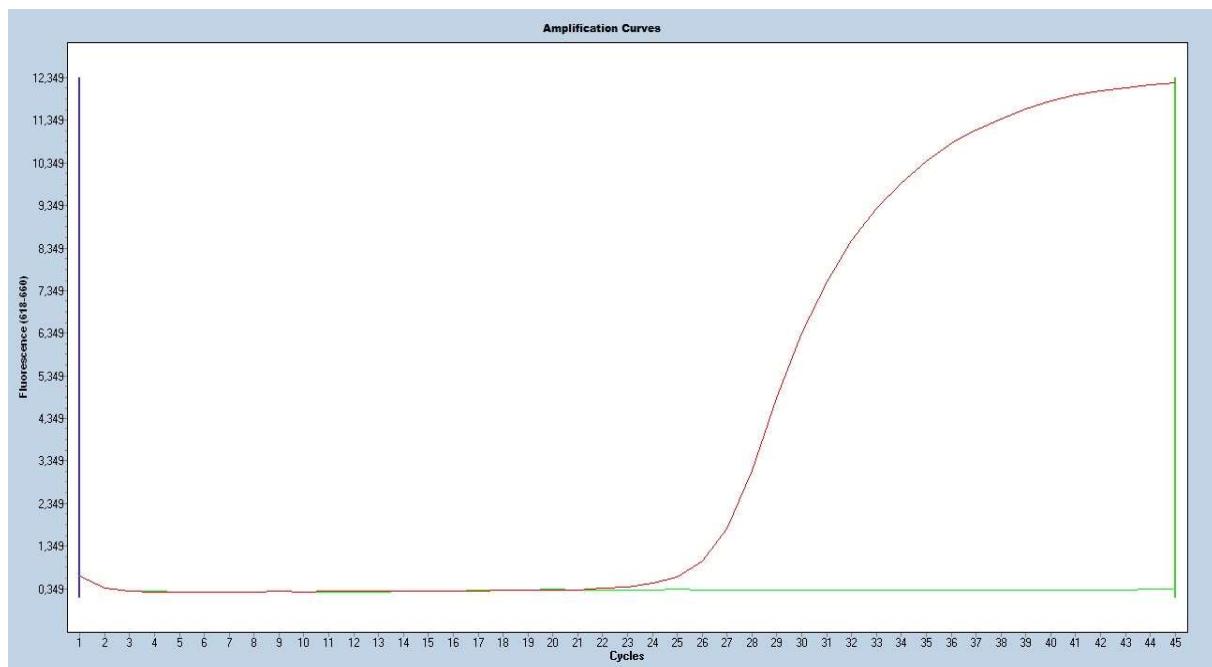
- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionalidad de los dispositivos usados
- Ejecución correcta de la prueba



**Figura 1:** Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Chlamydophila pneumoniae*) en el LightCycler® 480II



**Figura 2:** Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Legionella pneumophila*) en el LightCycler® 480II



**Figura 3:** Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*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

Detección de				
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Resultado
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo/negativo	<i>C. pneumoniae</i> detectable
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo/negativo	<i>L. pneumophila</i> detectable
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo/negativo	<i>M. pneumoniae</i> detectable
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo/negativo	<i>C. pneumoniae</i> y <i>L. pneumophila</i> detectables
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo/negativo	<i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i> detectables
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo/negativo	<i>L. pneumophila</i> y <i>M. pneumoniae</i> detectables
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo/negativo	<i>C. pneumoniae</i> , <i>L. pneumophila</i> y <i>M. pneumoniae</i> detectables
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Genes diana no detectables
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No válido

Se determina que una muestra es positiva si tanto el ADN de la muestra como el Internal Control DNA muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se determina que una muestra es positiva si el ADN de la muestra presenta una señal de amplificación pero no puede encontrarse ninguna señal de amplificación del Internal Control DNA en el sistema de detección. La detección del Internal Control DNA no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del Internal Control DNA.

La muestra se considera negativa si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero sí 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 Internal Control DNA.

Se determina que una muestra no es válida si tanto el ADN de la muestra como el Internal Control DNA no presentan señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción. La muestra extraída debe diluirse 1:10 con agua para PCR y amplificarse de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

## 12. Limitaciones del método

1. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre debe tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo es válido únicamente para muestras de lavado broncoalveolar (LBA).
3. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados no evaluables.
4. Los resultados obtenidos con este producto dependen de la identificación, extracción, transporte, almacenamiento y manejo adecuados de la muestra. Por lo tanto, es crítico ejecutar estos pasos cuidadosamente y seguir las instrucciones del fabricante de los productos para la extracción de ácido nucleico. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica, pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
5. El uso de este producto exige ropa de trabajo y áreas de trabajo adecuadas para manipular muestras biológicas y preparados químicos potencialmente infecciosos clasificados como peligrosos con el fin de evitar accidentes que involucren posibles consecuencias serias para el usuario y para otras personas.
6. Este producto solo puede ser usado por personal calificado capacitado para ejecutar procedimientos biológicos moleculares tales como extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Este requisito debería evitar resultados falsos.
7. Para el procesamiento manual, asegúrese de que la preparación/extracción de la muestra, la preparación de la PCR y la PCR se lleven a cabo en cuartos separados, con el fin de evitar resultados positivos falsos.
8. Para el procesamiento manual, se requieren vestimenta e instrumentos aparte para la preparación/extracción de la muestra, preparación de la PCR y la PCR, con el fin de evitar resultados falsos positivos durante el uso de este producto.
9. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LD). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
10. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados - negativos falsos con RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac.

11. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LD). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
12. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que los genes diana (*Chlamydophila pneumoniae* [ARNr 16S], *Legionella pneumophila* [ARNr 16S] y *Mycoplasma pneumoniae* [IGS]) están presentes.
13. Las sustancias paracodeína, ciprofloxacino y guaifenesina/dextrometorfano pueden manifestar propiedades interferentes incluso en cantidades pequeñas.

### **13. Características de rendimiento**

#### **13.1 Rendimiento clínico**

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA<sup>®</sup>GENE CAP se comparó en un laboratorio externo con el método de ensayo por PCR en tiempo real para patógenos específicos (análogo a los métodos de ensayo por PCR acreditados conforme a DIN EN ISO 15189:2007) en los equipos LightCycler<sup>®</sup> 480 II y LightCycler<sup>®</sup> 2.0. En general, se analizaron 282 muestras de retención de extractos de ácidos nucleicos de materiales para pruebas clínicas de vías respiratorias (LBA). Se detectaron resultados no válidos en 17 muestras (6 %) debido a la detección negativa del control interno de ADN, el cual indica una detección sensible de los resultados del inhibidor por parte del ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac. Estas muestras no se incluyeron en la evaluación.

Los resultados de cada patógeno se muestran en las tablas 12 a 14:

**Tabla 12:** Detección de *Chlamydia pneumoniae* (CP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>C. pneumoniae</i>		Total
Interno CP	Positivo	Positivo	Negativo	
	Negativo	0	235	235
	Total	30	235	265

Sensibilidad	100,0 %
Especificidad	100,0 %
PPV	100,0 %
NPV	100,0 %

**Tabla 13:** Detección de *Mycoplasma pneumoniae* (MP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>M. pneumoniae</i>		Total
Interno MP	Positivo	Positivo	Negativo	
	Negativo	0	215	215
	Total	50	215	265

Sensibilidad	100,0 %
Especificidad	100,0 %
PPV	100,0 %
NPV	100,0 %

**Tabla 14:** Detección de *Legionella pneumophila* (LP)

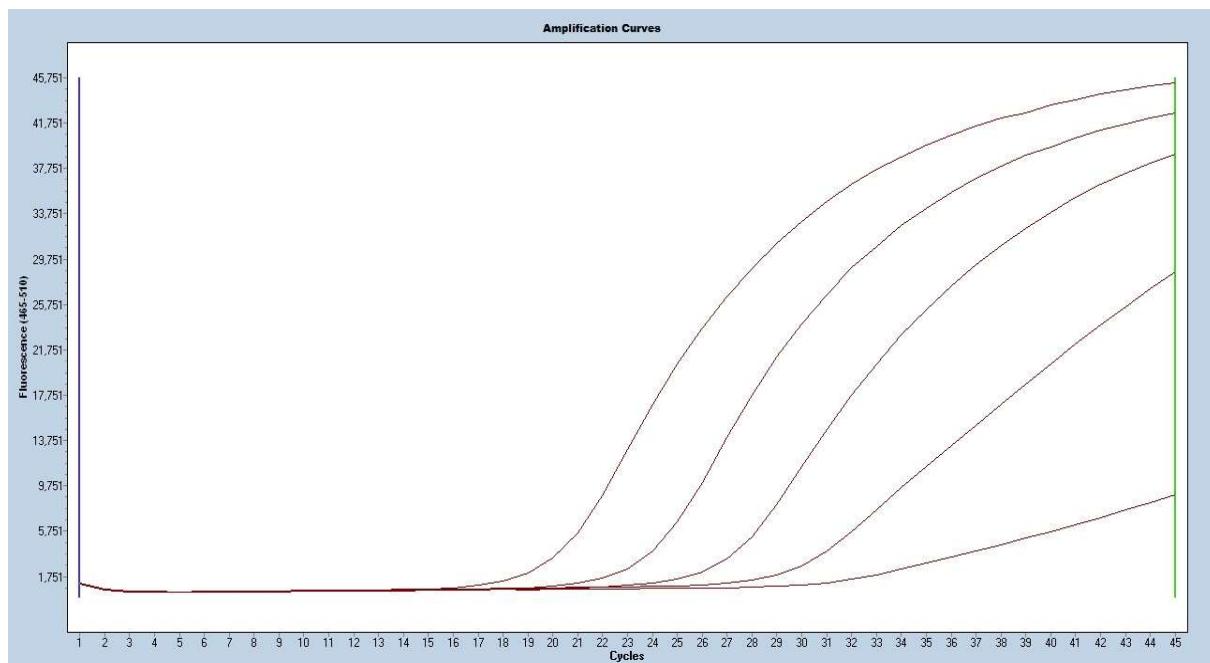
		RIDA®GENE CAP Bac – <i>L. pneumophila</i>		Total
Interno LP	Positivo	Positivo	Negativo	
	Negativo	5	210	215
	Total	55	210	265

Sensibilidad	100,0 %
Especificidad	97,7 %
PPV	90,9 %
NPV	100,0 %

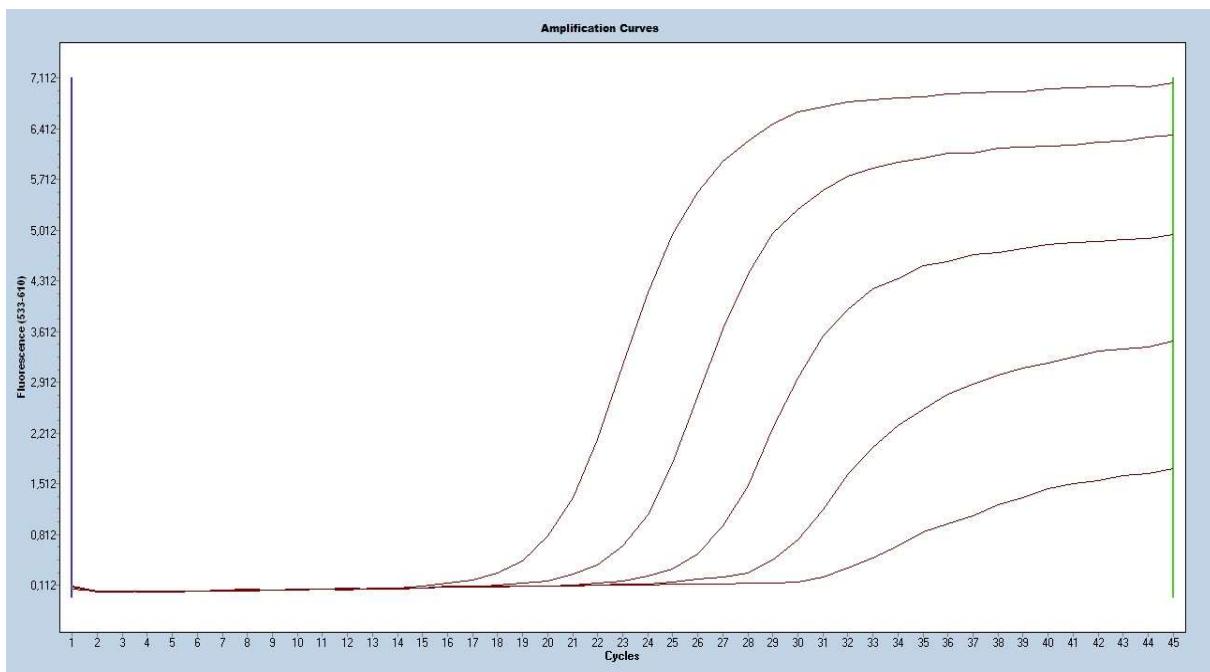
### 13.2 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE CAP Bac tiene un límite de detección de  $\geq 50$  copias de ADN por reacción para *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae*.

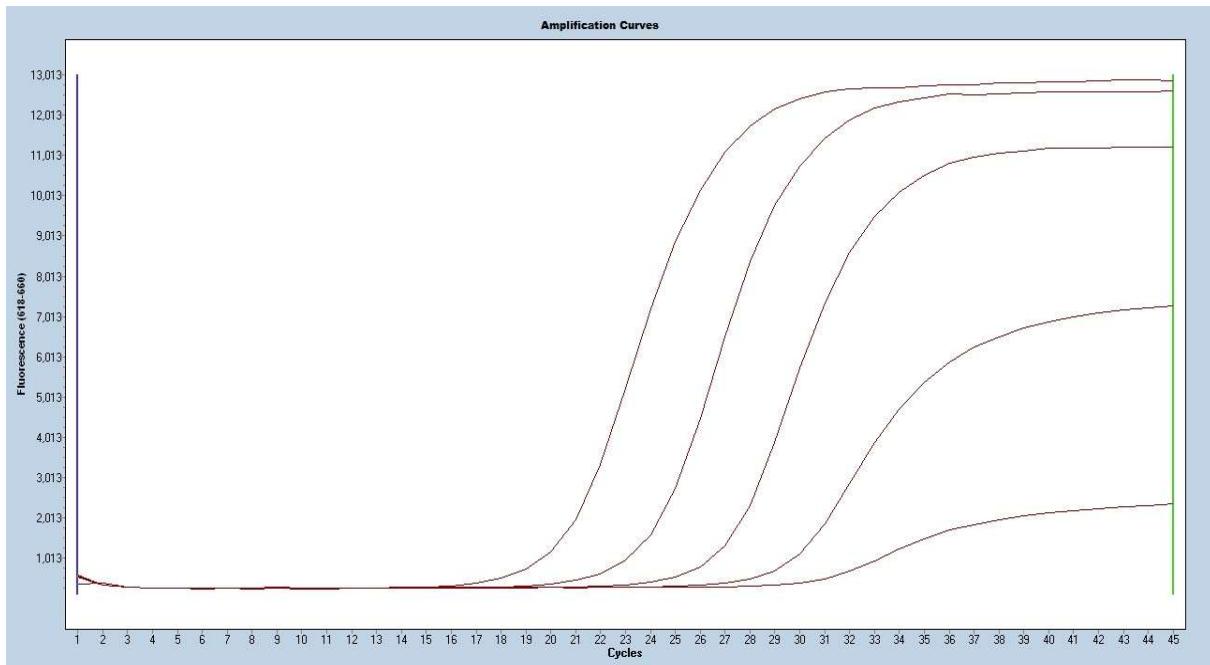
En las figuras 4, 5 y 6 a continuación se muestran las diluciones seriadas de *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* (cada una de  $5 \times 10^5$  a  $10^1$  copias de ADN/reacción) en el LightCycler® 480II.



**Figura 4:** Dilución seriada de *Chlamydophila pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  a  $10^1$  copias de ADN/reacción) en el LightCycler® 480II



**Figura 5:** Dilución seriada de *Legionella pneumophila* ( $5 \times 10^5$  a  $10^1$  copias de ADN/reacción) en el LightCycler® 480II



**Figura 6:** Dilución seriada de *Mycoplasma pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  a  $10^1$  copias de ADN/reacción) en el LightCycler® 480II

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

### 13.3 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac es específico para *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae*. No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

**Tabla 15:** Ensayos de reactividad cruzada

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

### 13.4 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE CAP Bac se estudió con serogrupos de *Legionella pneumophila* (consulte la tabla 13). Los serogrupos de *Legionella pneumophila* analizados se detectaron mediante el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE CAP Bac.

**Tabla 16:** Pruebas de reactividad analítica

Legionella pneumophila					
Serogrupo 1	+	Serogrupo 6	+	Serogrupo 11	+
Serogrupo 2	+	Serogrupo 7	+	Serogrupo 12	+
Serogrupo 3	+	Serogrupo 8	+	Serogrupo 13	+
Serogrupo 4	+	Serogrupo 9	+	Serogrupo 14	+
Serogrupo 5	+	Serogrupo 10			

### 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-09-10	Versión de lanzamiento

### 15. Explicación de los símbolos

#### Símbolos generales

<b>IVD</b>	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
<b>LOT</b>	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
<b>REF</b>	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

## Símbolos específicos de prueba

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Bibliografía

1. Höffken *et al.* [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. Pneumologie. 2009; 63:e1-68.
2. Ramirez *et al.* Changing needs of community-acquired pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011. 66 Suppl 3:iii3-9.
3. 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.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Mycoplasma pneumoniae* Infections. 2018.  
<https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>. Accessed: 14.08.2019.
5. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Chlamydiosen (Teil 2): Erkrankungen durch Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae und Simkania negevensis. 2010. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Chlamydiosen\\_Teil2.html#doc2382910bodyText15](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil2.html#doc2382910bodyText15). Accessed: 15.08.2019
6. Sharma L. *et al.* Atypical Pneumonia: Updates on Legionella, Chlamydophila, and Mycoplasma Pneumonia. Clin Chest Med. 2017. 38 (1):45-58.
7. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
8. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Legionellose. 2019.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Legionellos\\_e.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Legionellos_e.html). Accessed: 01.10.2019

9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.



# RIDA®GENE CAP Bac

**REF**

PG2705

## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE CAP Bac est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac est destiné à faciliter le diagnostic des pneumonies communautaires (PC) provoquées par *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ou *Mycoplasma pneumoniae*.

## 2. Résumé et explication du test

La pneumonie communautaire (PC) est la maladie infectieuse la plus souvent signalée dans le monde entier et, dans les pays occidentaux, est la maladie infectieuse qui occasionne le plus de décès. En Allemagne, on dénombre jusqu'à 600 000 cas de PC par an, et la mortalité varie de 0,6 % à 14 % selon que la PC touche des patients hospitalisés ou en ambulatoire<sup>1</sup>. Les bactéries sont les agents pathogènes les plus fréquents dans la PC et la distinction s'opère entre agents pathogènes typiques et atypiques. Les bactéries atypiques ne peuvent pas être cultivées dans une culture habituelle de crachats ou de sang et ne sont pas visibles par coloration Gram. Cela complique la détection des bactéries de PC atypiques étant donné que les méthodes standard ne permettent pas généralement de les identifier. Les bactéries de PC atypiques les plus fréquentes sont notamment *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Legionella* spp. et *Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*)<sup>2</sup>.

Jusqu'à 20 % des pneumonies touchant des patients en ambulatoire sont provoquées par *M. pneumoniae*,<sup>3</sup> qui est une bactérie très infectieuse dépourvue de paroi cellulaire et qui se transmet essentiellement par voie aérienne par des gouttelettes ou par un contact direct ou indirect. *M. pneumoniae* ne fait pas partie de la flore habituelle de l'humain et est généralement détectée chez les enfants et les jeunes adultes. La pneumonie se développe dans 5 à 25 % des cas par des infections par *M. pneumoniae* et nécessite généralement une antibiothérapie<sup>4</sup>. *Chlamydophila pneumoniae* est une bactérie à Gram négatif qui se transmet généralement par voie aérienne<sup>5</sup>. Une infection par *C. pneumoniae* est souvent difficile à soigner, mais sans gravité<sup>5,6</sup>. On estime que le taux de prévalence de

*C. pneumoniae* varie de 50 à 70 % et que 60 % de la population aura subi une infection par *C. pneumoniae* à l'âge de 20 ans. Dans les cas graves, elle peut évoluer en pneumonie atypique. En Allemagne, on estime que jusqu'à 5 % du nombre de PC sont occasionnées par *C. pneumoniae*<sup>1,5</sup>. La bactérie peut vivre dans les voies respiratoires supérieures pendant de nombreuses années, ce qui fait que le danger d'infection peut persister pendant longtemps. Les méthodes de détection classiques des antigènes comme ELISA présentent une faible spécificité et ne peuvent être utilisées qu'après plusieurs semaines d'infection aiguë. La PCR peut détecter l'agent pathogène de manière fiable à partir d'échantillons ou de tissus du système respiratoire<sup>5</sup>.

La souche de Legionella, qui appartient à la famille des *Legionellaceae*, se divise en 40 espèces et plus de 70 sérogroupes. La bactérie Legionella fait partie des bactéries intracellulaires facultatives à Gram négatif dont le pic d'infection est atteint en été et au début de l'automne. Dans le cas de la légionellose, on distingue les infections communautaires, les infections dues à un déplacement et les infections nosocomiales. Aux États-Unis, le taux de mortalité liée aux infections nosocomiales varie de 15 à 20 %. En Europe, 12 % des infections par Legionella sont mortelles<sup>7</sup>. Toutes les espèces de Legionella doivent être considérées comme potentiellement pathogènes pour l'être humain. Cependant, en Europe, la plupart des maladies communautaires sont provoquées par des agents pathogènes du séro groupe 1 de *Legionella pneumophila*. Une infection par *Legionella pneumophila* provoque essentiellement la maladie du légionnaire (aussi appelée légionellose)<sup>8</sup>.

### 3. Principe du test

Le test RIDA®GENE CAP Bac est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain.

Après isolement de l'ADN, on procède à l'amplification des fragments de gène (si présents) spécifiques à *Chlamydophila pneumoniae* (ARNr-16S), *Legionella pneumophila* (ARNr-16S) et *Mycoplasma pneumoniae* (IGS). Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont fixées à une extrémité à l'extincteur et à l'autre extrémité à un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). Les sondes s'hybrident avec les amplicons en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la **Taq-Polymerase** sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE CAP Bac contient un **Internal Control DNA** (ICD) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou l'éventuelle inhibition de la PCR.

#### 4. Contenu de la trousse

**Tableau 1:** Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations.)

Code du kit	Réactifs	Quantité	Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl
N	No Template Control	1x	450 µl
P	Positive Control	1x	200 µl

#### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 20 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 °C à 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants:

**Tableau 2:** Matériel nécessaire

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Dispositifs de PCR en temps réel	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Remarque:** En cas d'utilisation du Rotor-Gene Q (QIAGEN), utiliser uniquement des flacons de réaction de 0,1 ml.

Si vous devez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de) pour en vérifier la compatibilité.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les instruments LightCycler® 480II et LightCycler® 480 z
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, flacons de réaction, films)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes pour pipette dotées de filtres
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

## **7. Mesures de précaution**

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

### **7.1 Mesures de précaution d'ordre général**

Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Lire attentivement le mode d'emploi avant de réaliser des tests et respecter les instructions à la lettre.

Les échantillons biologiques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux et doivent être manipulés et éliminés comme il se doit. Éviter tout contact direct avec des échantillons biologiques. Éviter la formation de jets et de pulvérisations. Tout matériel exposé à des échantillons biologiques doit être éliminé conformément aux réglementations applicables. Les matériaux jetables inflammables doivent être incinérés. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant leur élimination.

Les utilisateurs sont responsables de l'élimination adéquate de tous les réactifs et matériaux après leur utilisation, conformément aux normes de sécurité en vigueur. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants, blouse, lunettes de protection, masque de protection adaptés) et se laver soigneusement les mains à l'issue du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Ne pas fumer, manger, boire, ni utiliser de produits cosmétiques dans les zones de travail. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.

Éliminer le kit de test à l'échéance de la date de péremption. Utiliser uniquement les réactifs fournis avec le produit et recommandés par le fabricant. Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants.

## **7.2 Mesures de précaution en biologie moléculaire**

Les procédures de biologie moléculaire comme l'extraction d'acides nucléiques, l'amplification et la détection doivent être réalisées par un personnel de laboratoire formé et qualifié pour éviter tout risque de résultats erronés, notamment dus à la dégradation de l'acide nucléique dans les échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits de l'amplification.

En cas de traitement manuel, veiller à ce que la préparation/extraction des échantillons, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR soient effectuées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée. Ne jamais faire entrer les produits de l'amplification dans les zones où sont effectuées la préparation/extraction des échantillons et la préparation de la PCR. Chaque zone (préparation/extraction des échantillons, préparation de la PCR, exécution de la PCR) exige l'utilisation de blouses de laboratoire, de gants et d'instruments différents, exclusivement prévus pour la zone en question. Les blouses, gants et instruments de la zone d'exécution de la PCR ne doivent jamais être utilisés dans la zone de préparation/extraction des échantillons ou celle de préparation de la PCR.

Les échantillons doivent uniquement être utilisés pour ce type d'analyse et être traités dans un poste de sécurité microbiologique. Ne jamais ouvrir en même temps des flacons d'échantillons différents. Les pipettes utilisées pour la préparation des échantillons doivent uniquement servir à cette fin.

Les réactifs nécessaires doivent être traités sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de façon adaptée à une procédure de test. Les pipettes utilisées pour les réactifs doivent uniquement servir à cette fin. N'utiliser que des pipettes à déplacement positif ou des pipettes avec pointes à filtre. Les pointes de pipette doivent être stériles et exemptes d'ADNase et d'ARNase ainsi que d'ADN et d'ARN.

Pour éviter toute contamination, manipuler les produits de l'amplification de manière à éviter du mieux possible leur propagation dans l'environnement. Les pipettes utilisées pour les produits de l'amplification doivent uniquement servir à cette fin.

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation de l'ADN à partir d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Pour isoler l'ADN à partir d'un LBA, les échantillons utilisés doivent être conservés selon les directives du laboratoire. Ils ne doivent pas être conservés ou transportés pendant plus de 24 heures après le prélèvement. Les échantillons qui ont été transportés et/ou conservés pendant plus de 24 heures doivent être conservés pendant 72 heures maximum entre +2 °C et +8 °C. Les échantillons conservés pendant plus de 72 heures doivent être placés à -70 °C<sup>9</sup>.

Il est recommandé de préparer des aliquotes des échantillons pour éviter des cycles répétés de décongélation/congélation. Les échantillons congelés doivent être décongelés immédiatement avant extraction pour éviter toute dégradation de l'acide nucléique.

Un kit d'extraction d'acides nucléiques commercialisé (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) est recommandé pour la préparation de l'ADN à partir d'un liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE CAP Bac comprend un **Internal Control DNA** qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le **Internal Control DNA** peut être utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition ou comme contrôle de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus du contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en utiliser 20 µl pendant l'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** par réaction au mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif.

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger et centrifuger brièvement le mélange réactif **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, le contrôle positif **Positive Control**, le contrôle sans matrice **No Template Control** et l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** avant utilisation. Toujours refroidir tous les réactifs pendant les étapes de travail (2 °C à 8 °C).

**Tableau 3:** Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICD pour extraction et contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

**Tableau 4:** Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (flacon/plaque).

**Contrôle négatif :** Pipeter 5 µl de **No Template Control** dans le mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** dans le mélange pour PCR pour le contrôle négatif lorsque le **Internal Control DNA** est utilisé pour le contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et pour le contrôle de l'inhibition.

**Échantillons :** Pipeter 5 µl d'éluat dans le mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif :** Pipeter 5 µl de **Positive Control** dans le mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** dans le mélange pour PCR pour le contrôle positif lorsque le **Internal Control DNA** est utilisé pour le contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et pour le contrôle de l'inhibition.

Fermer hermétiquement les flacons ou les plaques de réaction, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon les réglages du dispositif (voir tableaux 5, 6, 7 et 8).

### 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

#### 9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

**Tableau 5:** Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® Rotor-Gene Q, RIDA®CYCLER

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 6:** Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

**Remarque:** Le profil universel de PCR en temps réel pour les tests d'ADN ne devrait être utilisé que si les tests de PCR en temps réel RIDA®GENE DNA et RIDA®GENE RNA sont combinés dans un même test.

**Tableau 7:** Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler® et RIDA®CYCLER

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 8:** Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température	Maximale

**Remarque:** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

## 9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 9: Sélection des canaux de détection adéquats

Dispositif de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Vert	-
	ICD	Jaune	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rouge	
Roche LightCycler® 480II	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	533/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	610/670	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Régler le colorant de référence sur aucun.
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Vert	Les réglages de gain doivent être définis sur 5 (valeur par défaut) pour tous les canaux.
	ICD	Jaune	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Orange	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rouge	

## 10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel correspondant conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figures 1, 2 et 3).

Le contrôle positif **Positive Control** a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu\text{l}$ . Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de  $5 \times 10^3$  copies.

**Tableau 10:** Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	Résultat	Ct ICD	Gène Ct cible
Contrôle positif	Positif	SO *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

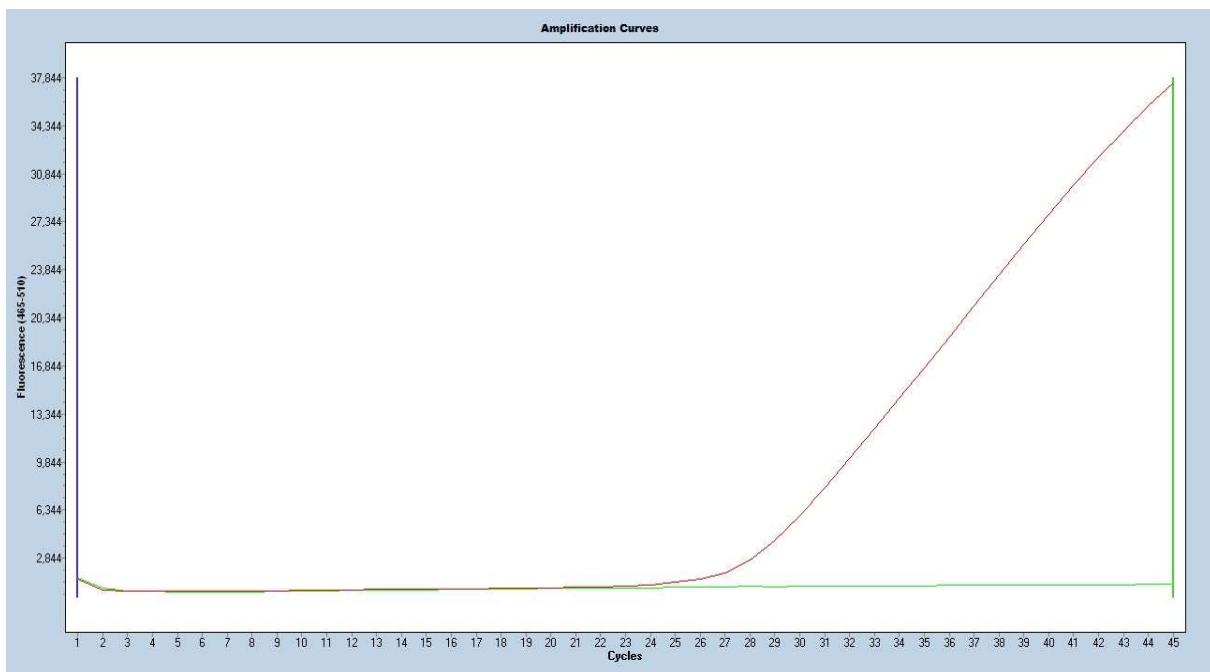
\*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

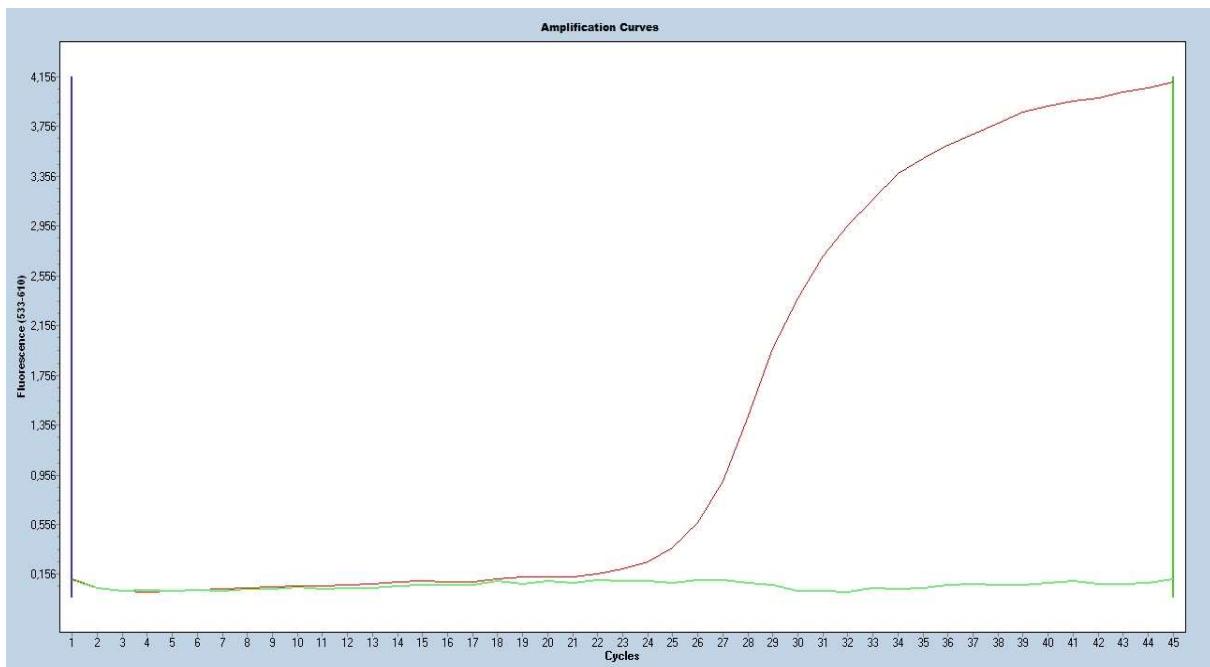
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

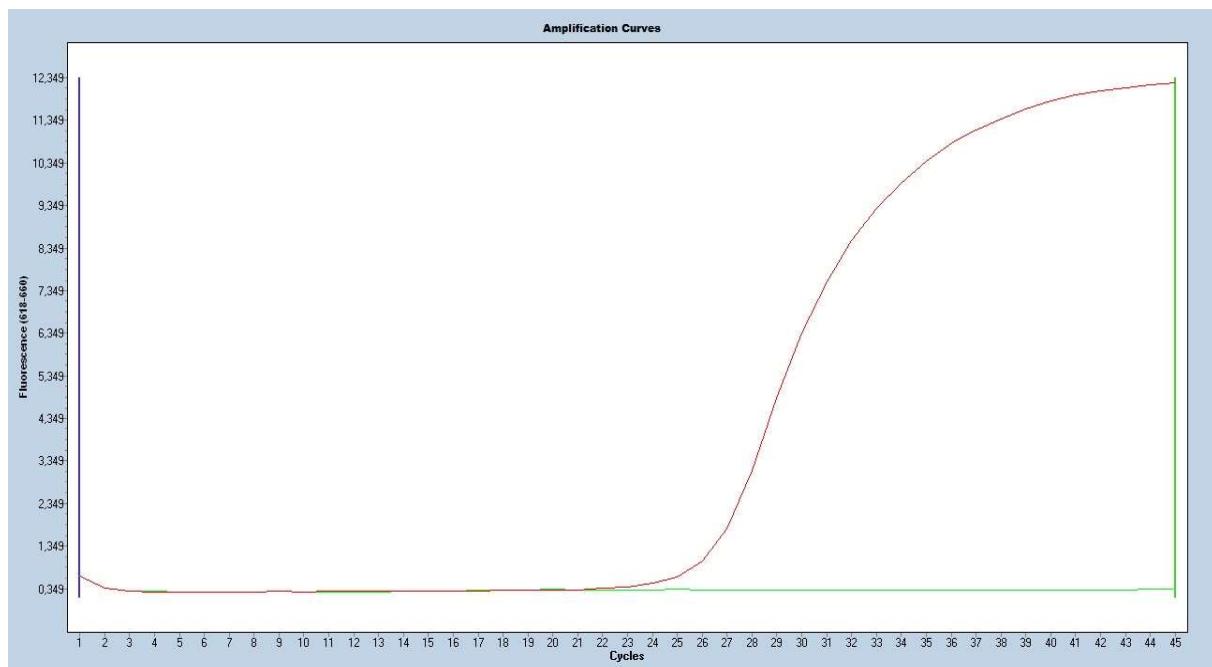
- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnalité des dispositifs utilisés
- Réalisation correcte du test



**Figure 1:** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Chlamydophila pneumoniae*) sur le LightCycler® 480II



**Figure 2 :** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Legionella pneumophila*) sur le LightCycler® 480II



**Figure 3:** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Mycoplasma pneumoniae*) sur le LightCycler® 480II

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11:** Interprétation des échantillons

Détection				
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Résultat
<b>Positif</b>	Négatif	Négatif	<b>Positif/négatif</b>	<i>C. pneumoniae</i> détectable
Négatif	<b>Positif</b>	Négatif	<b>Positif/négatif</b>	<i>L. pneumophila</i> détectable
Négatif	Négatif	<b>Positif</b>	<b>Positif/négatif</b>	<i>M. pneumoniae</i> détectable
<b>Positif</b>	<b>Positif</b>	Négatif	<b>Positif/négatif</b>	<i>C. pneumoniae et L. pneumophila</i> détectables
<b>Positif</b>	Négatif	<b>Positif</b>	<b>Positif/négatif</b>	<i>C. pneumoniae et M. pneumoniae</i> détectables
Négatif	<b>Positif</b>	<b>Positif</b>	<b>Positif/négatif</b>	<i>L. pneumophila et M. pneumoniae</i> détectables
<b>Positif</b>	<b>Positif</b>	<b>Positif</b>	<b>Positif/négatif</b>	<i>C. pneumoniae, L. pneumophila et M. pneumoniae</i> détectables
Négatif	Négatif	Négatif	<b>Positif</b>	Gènes cibles non détectables
Négatif	Négatif	Négatif	<b>Négatif</b>	Non valide

Un échantillon est estimé positif si l'ADN de l'échantillon et le **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est aussi estimé positif si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification, mais que le signal d'amplification n'est pas présent dans le système de détection pour le **Internal Control DNA**. La détection du **Internal Control DNA** n'est pas indispensable dans ce cas, car les concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du **Internal Control DNA**.

Un échantillon est estimé négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification, mais en présente un pour le **Internal Control DNA** dans le système de détection. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et le **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le

processus d'extraction. L'échantillon extrait doit être dilué à 1/10 avec de l'eau de PCR et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

## 12. Limites de la méthode

1. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement valide pour le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA).
3. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut empêcher l'évaluation des résultats.
4. Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de la qualité de l'identification, de l'extraction, du transport, de la conservation et de la manipulation de l'échantillon. Il est donc crucial d'effectuer ces étapes avec soin et de suivre les instructions fournies par le fabricant des produits d'extraction d'acide nucléique. Un prélèvement, échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
5. L'utilisation de ce produit implique le port de vêtements appropriés et doit rester confinée à des zones adaptées à la manipulation d'échantillons biologiques potentiellement infectieux et de préparations chimiques classées comme dangereuses afin d'éviter les accidents pouvant entraîner des conséquences graves pour l'utilisateur et d'autres personnes.
6. L'utilisation de ce produit est réservée à un personnel qualifié formé aux procédures de biologie moléculaire telles que l'extraction, l'amplification et la détection d'acides nucléiques. Le respect de cette exigence devrait permettre d'éviter l'obtention de résultats erronés.
7. En cas de traitement manuel, veiller à ce que la préparation/extraction des échantillons, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR soient effectuées dans des salles différentes afin d'éviter la survenue de résultats faux positifs.
8. En cas de traitement manuel, veiller à ce que la préparation/extraction des échantillons, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR soient effectuées avec des vêtements et des instruments différents afin d'éviter l'obtention de résultats faux positifs lors de l'utilisation de ce produit.
9. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
10. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac.

11. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
12. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles (*Chlamydophila pneumoniae* (ARNr-16S), *Legionella pneumophila* (ARNr-16S) et *Mycoplasma pneumoniae* (IGS)) sont présents.
13. Les substances paracodéine, ciprofloxacine et guaïfénésine/dextrométhorphane peuvent manifester des propriétés d'interférence même en petites quantités.

## 13. Performances

### 13.1 Performance clinique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac a été comparé dans un laboratoire extérieur à la méthode de test de PCR en temps réel spécifique pour l'agent pathogène du laboratoire (anologue aux méthodes de test de PCR agréées selon la norme DIN EN ISO 15189:2007) en utilisant les instruments LightCycler® 480 II et LightCycler® 2.0. Au total, 282 échantillons de rétention d'extraits d'acides nucléiques de matériel respiratoire pour test clinique (LBA) ont été testés. Un résultat non valide a été détecté dans 17 échantillons (6 %) en raison de l'absence de détection de l'ADN de contrôle interne, ce qui indique une détection sensible de résultats d'inhibition par le test RIDA®GENE CAP Bac. Ces échantillons n'ont pas été inclus dans l'évaluation.

Les résultats de chaque agent pathogène sont indiqués dans les tableaux 12 à 14:

**Tableau 12:** Détection de *Chlamydia pneumoniae* (CP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>C. pneumoniae</i>		Total
		Positif	Négatif	
En interne CP	Positif	30	0	30
	Négatif	0	235	235
Total		30	235	265

Sensibilité	100,0 %
Spécificité	100,0 %
VPP	100,0 %
VPN	100,0 %

**Tableau 13:** Détection de *Mycoplasma pneumoniae* (MP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>M. pneumoniae</i>		Total
		Positif	Négatif	
En interne PM	Positif	50	0	50
	Négatif	0	215	215
Total		50	215	265

Sensibilité	100,0 %
Spécificité	100,0 %
VPP	100,0 %
VPN	100,0 %

**Tableau 14:** Détection de *Legionella pneumophila* (LP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>L. pneumophila</i>		Total
		Positif	Négatif	
En interne PB	Positif	50	0	50
	Négatif	5	210	215
Total		55	210	265

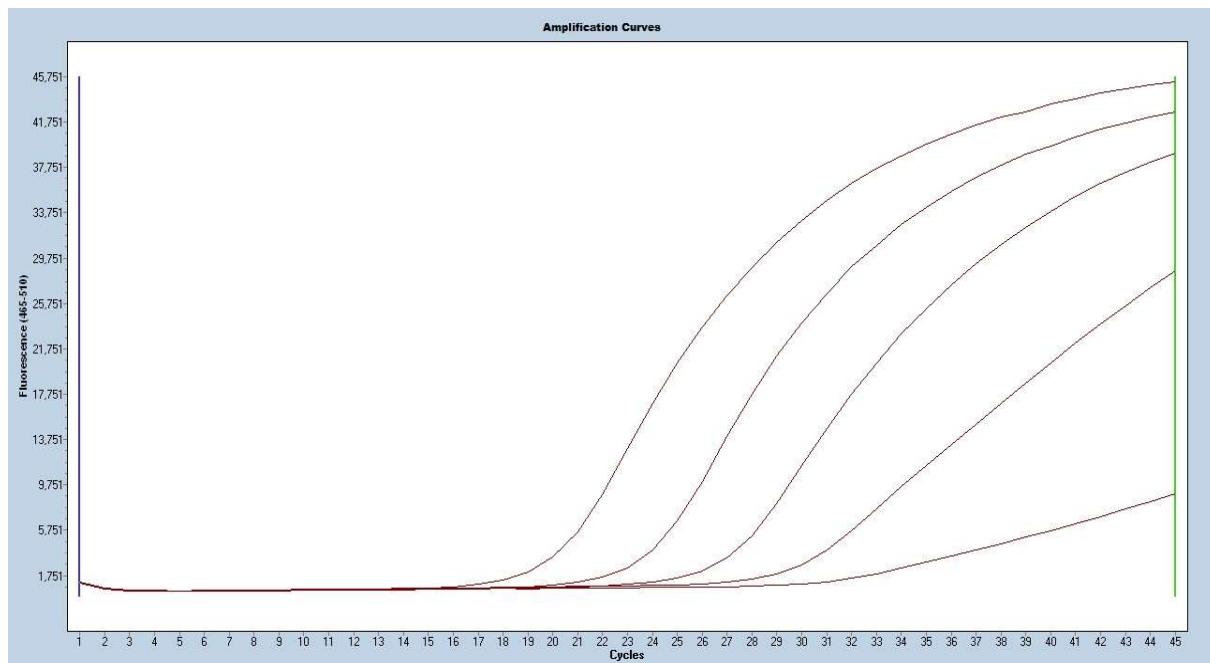
  

Sensibilité	100,0 %
Spécificité	97,7 %
VPP	90,9 %
VPN	100,0 %

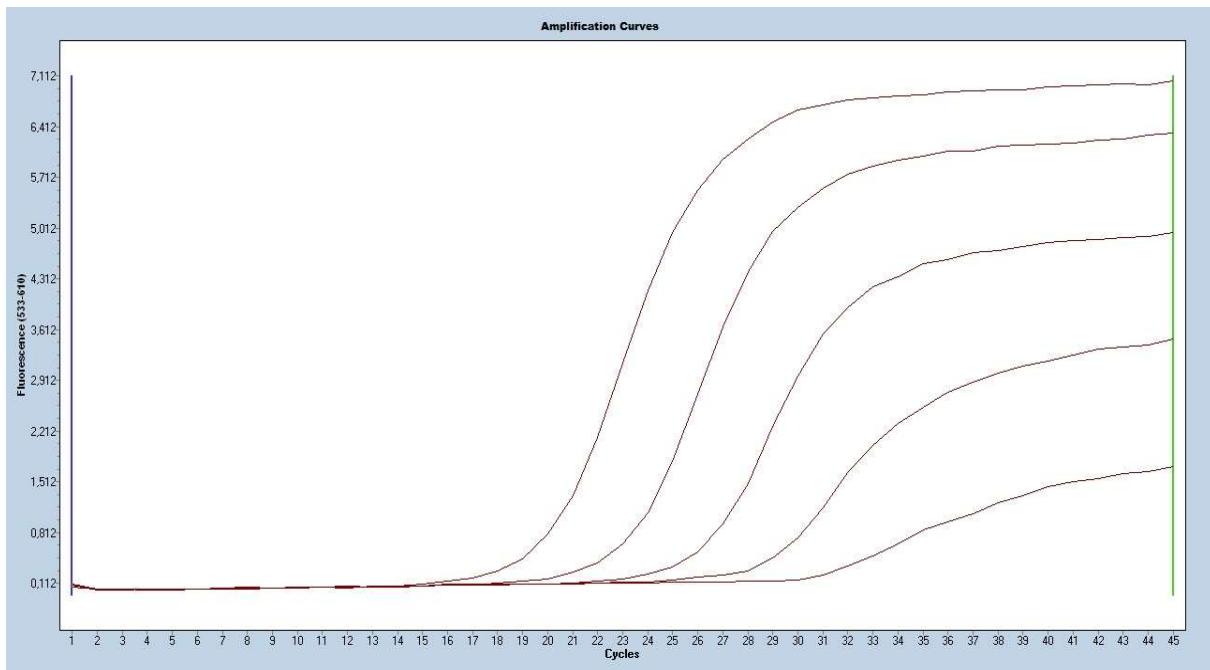
## 13.2 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE CAP Bac est  $\geq 50$  copies d'ADN par réaction pour *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae*.

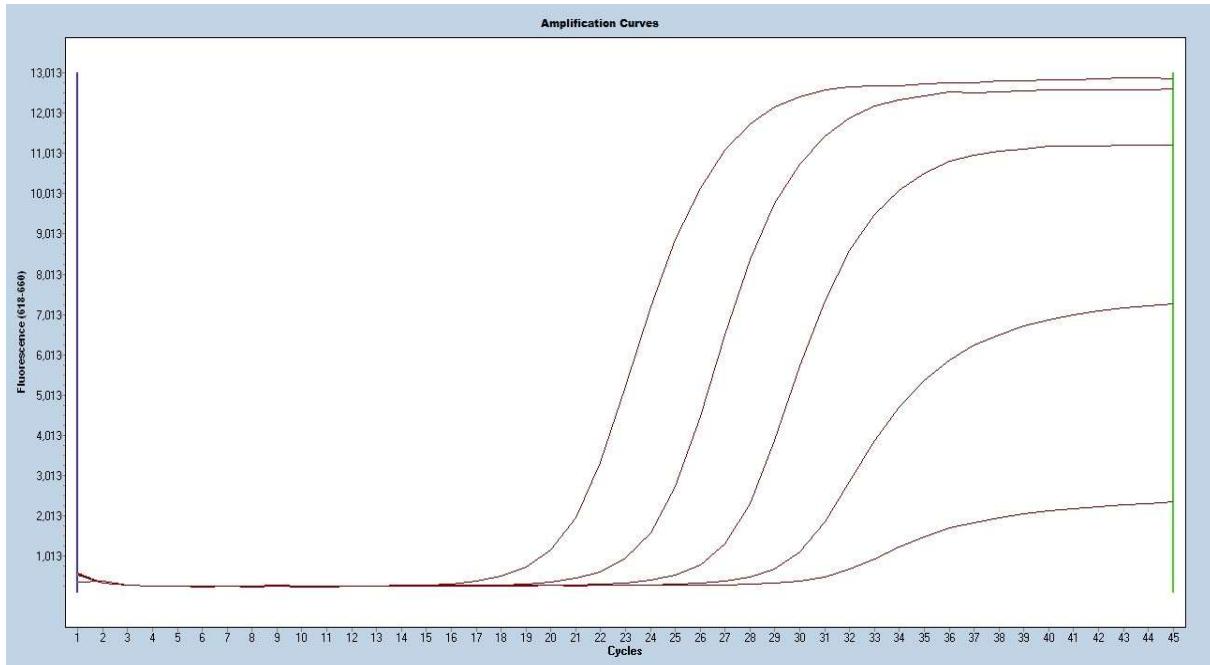
Les figures 4, 5 et 6 ci-dessous montrent une série de dilutions de *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae* (chacune à  $5 \times 10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II.



**Fig. 4:** Série de dilutions de *Chlamydophila pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II



**Figure 5:** Série de dilutions de *Legionella pneumophila* ( $5 \times 10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II



**Figure 6:** Série de dilutions de *Mycoplasma pneumoniae* ( $5 \times 10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN/réaction) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble du processus dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la teneur en ADN.

### 13.3 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac est spécifique à *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae*. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été décelée (voir tableau 12):

**Tableau 15:** Test de la réactivité croisée

Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	Échovirus 11	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Virus influenza B (B/Lee/40)	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	Entérovirus type 71	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Virus influenza, infectieux A/PR/8/34	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	-	Rhinovirus humain, génogroupe A	-	Virus parainfluenza 1, humain, souche C35	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	Virus parainfluenza 2, humain, souche Greer	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-	Virus parainfluenza 4b, humain, souche CH19503	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza, sérotype 3	-
Coronavirus 229E, humain	-	Metapneumovirus humain	-	Virus Herpes simplex 1, souche McIntyre	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche 9320	-
Coxsackie B4, humain	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	Virus Herpes simplex 2, souche MS	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche Long	-

### 13.4 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac a été examinée en utilisant des sérogroupes de *Legionella pneumophila* (voir tableau 13). Les sérogroupes de *Legionella pneumophila* testés ont été détectés à l'aide du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac.

**Tableau 16:** Test de la réactivité analytique

Legionella pneumophila					
Sérogroupe 1	+	Sérogroupe 6	+	Sérogroupe 11	+
Sérogroupe 2	+	Sérogroupe 7	+	Sérogroupe 12	+
Sérogroupe 3	+	Sérogroupe 8	+	Sérogroupe 13	+
Sérogroupe 4	+	Sérogroupe 9	+	Sérogroupe 14	+
Sérogroupe 5	+	Sérogroupe 10			

### 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-09-10	Version de la publication

### 15. Signification des symboles

#### Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Utiliser avant le
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

## Symboles spécifiques des tests

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Bibliographie

1. Höffken *et al.* [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. Pneumologie. 2009; 63:e1-68.
2. Ramirez *et al.* Changing needs of community-acquired pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011. 66 Suppl 3:iii3-9.
3. 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.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Mycoplasma pneumoniae* Infections. 2018.  
<https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>. Accessed: 14.08.2019.
5. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Chlamydiosen (Teil 2): Erkrankungen durch Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae und Simkania negevensis. 2010. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Chlamydiosen\\_Teil2.html#doc2382910bodyText15](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil2.html#doc2382910bodyText15). Accessed: 15.08.2019
6. Sharma L. *et al.* Atypical Pneumonia: Updates on Legionella, Chlamydophila, and Mycoplasma Pneumonia. Clin Chest Med. 2017. 38 (1):45-58.
7. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
8. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Legionellose. 2019.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Legionellos\\_e.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Legionellos_e.html). Accessed: 01.10.2019
9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for

Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.



# RIDA®GENE CAP Bac

**REF** PG2705

## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*, RIDA®GENE CAP Bac è un test PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*), *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae* in campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) umano.

Il test PCR real-time multiplex RIDA®GENE CAP Bac è adatto come ausilio nella diagnosi della polmonite acquisita in comunità (CAP) causata da *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, o *Mycoplasma pneumoniae*.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

La polmonite acquisita in comunità (CAP) è la malattia infettiva più frequentemente registrata in tutto il mondo, e quella che più spesso causa la morte nelle nazioni occidentali. In Germania, ogni anno, si registrano fino a 600.000 casi di CAP e la mortalità varia tra lo 0,6 % e il 14 %, a seconda che la CAP sia ambulatoriale od ospedaliera.<sup>1</sup> I batteri sono i patogeni più frequenti della CAP e sono suddivisi in tipici e atipici. I batteri atipici non possono essere coltivati in una comune coltura di espettorato o di sangue; inoltre, non possono essere visualizzati tramite la colorazione di Gram. Rilevare i batteri atipici della CAP è dunque complesso, poiché i metodi standard ne rendono generalmente impossibile l'identificazione. I batteri atipici della CAP più frequenti includono *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Legionella* spp., e *Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*).<sup>2</sup>

Fino al 20% delle polmoniti ambulatoriali ha come fattore scatenante *M. pneumoniae*.<sup>3</sup> *M. pneumoniae* è un batterio molto infettivo, privo di parete cellulare, che viene trasmesso principalmente attraverso goccioline aeree o per contatto diretto o indiretto attraverso oggetti contaminati. *M. pneumoniae* non appartiene alla normale flora umana e viene generalmente identificato nei bambini e nei giovani adulti. La polmonite si sviluppa nel 5 %-25 % dei casi di infezione da *M. pneumoniae* e richiede generalmente un ulteriore trattamento con antibiotici.<sup>4</sup> *Chlamydophila pneumoniae* è un batterio Gram-negativo e viene generalmente trasmesso attraverso l'aria.<sup>5</sup> Un'infezione da *C. pneumoniae* è generalmente difficile da superare, ma lieve.<sup>5,6</sup> Si stima che *C. pneumoniae* abbia un tasso di prevalenza dal 50 % al 70 % e che il 60 % della popolazione abbia avuto un'infezione da *C. pneumoniae* entro i 20 anni d'età. Un caso grave può causare una polmonite

atipica. In Germania, si stima che fino al 5 % delle polmoniti tipo CAP sia causata da *C. pneumoniae*.<sup>1,5</sup> I batteri possono vivere nel tratto respiratorio superiore per molti anni, prolungando quindi il pericolo d'infezione. I classici metodi di rivelazione dell'antigene come i test ELISA hanno una specificità limitata e possono essere utilizzati solo dopo parecchie settimane di infezione acuta. La PCR riesce a identificare il patogeno in modo affidabile da campioni o tessuti respiratori.<sup>5</sup> Il ceppo Legionella appartiene alla famiglia delle *Legionellaceae* ed è suddiviso in 40 specie con oltre 70 sierogruppi. I batteri del genere Legionella sono Gram-negativi intracellulari facoltativi, il cui picco di infezione avviene in estate e all'inizio dell'autunno. Con la cosiddetta malattia dei legionari, si distingue tra infezioni contratte in comunità, contratte in viaggio e nosocomiali. Negli Stati Uniti, il tasso di mortalità delle infezioni nosocomiali è compreso tra il 15 % e il 20 %. In Europa, il 12 % di tutte le infezioni da legionella è fatale.<sup>7</sup> Tutte le specie di legionella sono da considerare potenzialmente patogene per l'uomo. In Europa, tuttavia, la maggior parte delle malattie acquisite in comunità è causata da patogeni della specie *Legionella pneumophila* sierogruppo 1. Un'infezione da *Legionella pneumophila* causa principalmente la malattia dei legionari (chiamata anche legionellosi).<sup>8</sup>

### 3. Principio del test

RIDA®GENE CAP Bac è un test PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta di *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, e *Mycoplasma pneumoniae* in campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) umano.

Dopo l'isolamento del DNA, vengono amplificati specifici frammenti genici (se presenti) di *Chlamydophila pneumoniae* (16S-rRNA), *Legionella pneumophila* (16S-rRNA), e *Mycoplasma pneumoniae* (IGS). Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi fissate a un quencher a un'estremità, e a un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. Le sonde ibridano con gli ampliconi in presenza di una sequenza target. Durante l'estensione, la

Taq-Polymerase separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale di fluorescenza 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 CAP Bac contiene un Internal Control DNA (ICD) per verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

#### 4. Contenuto della confezione

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

Codice del kit	Reagenti	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

- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con attenzione prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 - 8 °C).
- Il congelamento/o scongelamento ripetuto fino a 20 volte non influisce sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (2 - 8 °C).

## **6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari**

Il test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac può essere utilizzato con le seguenti piattaforme di estrazione e dispositivi PCR real-time:

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Dispositivi per PCR real-time	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> CYCLER
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480II, LightCycler <sup>®</sup> 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Avvertenze:** Quando si utilizza Rotor-Gene Q (QIAGEN), utilizzare solo cuvette di reazione da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre procedure di estrazione o dispositivi per la PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm all'indirizzo [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de) per verificare la compatibilità.

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler<sup>®</sup> 480II e LightCycler<sup>®</sup> 480 z
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, cuvette di reazione, pellicole)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione o piastre
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali per pipette con filtri
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

## **7. Precauzioni per gli utilizzatori**

Esclusivamente per la diagnostica *in vitro*.

### **7.1 Avvertenze generali e misure precauzionali**

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Prima di procedere leggere attentamente e per intero le istruzioni per l'uso e rispettarle scrupolosamente.

I campioni biologici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere manipolati e smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con campioni biologici. Evitare spruzzi o nebulizzazioni. I materiali che vengono a contatto con campioni biologici devono essere smaltiti in conformità con le normative applicabili. I materiali monouso infiammabili devono essere inceneriti. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dello smaltimento.

Gli utenti sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso, nel rispetto delle norme di sicurezza in vigore. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Per ulteriori dettagli consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) su [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice, occhiali di sicurezza, maschera facciale) e lavarsi le mani scrupolosamente dopo aver eseguito il test. Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Non fumare, bere, mangiare o usare cosmetici nelle aree di lavoro. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Dopo la data di scadenza smaltire il kit. Usare solo i reagenti forniti con il prodotto e raccomandati dal produttore. Non utilizzare reagenti provenienti da altri lotti. Non utilizzare reagenti di altri produttori.

## **7.2 Avvertenze e misure precauzionali sulle procedure di biologia molecolare**

Le procedure di biologia molecolare come l'estrazione, l'amplificazione e la rivelazione dell'acido nucleico richiedono personale di laboratorio addestrato e qualificato che sappia evitare il rischio di risultati errati, in particolare derivanti dalla degradazione dell'acido nucleico nei campioni o dalla contaminazione dei campioni con prodotti di amplificazione.

Per la processazione manuale, assicurarsi che la preparazione/l'estrazione del campione, la preparazione della PCR e la PCR avvengano in locali separati per evitare contaminazione crociata. Non portare mai i prodotti di amplificazione nelle aree di preparazione/estrazione del campione e di preparazione della PCR. Ogni area (preparazione/estrazione del campione, preparazione della PCR e PCR) richiede camici da laboratorio, guanti e attrezzature distinti, da usare esclusivamente in quell'area. Camici da laboratorio, guanti e attrezzature dell'area PCR non devono mai essere utilizzati nell'area di preparazione/estrazione del campione o nell'area di preparazione della PCR.

I campioni devono essere utilizzati solo per questo tipo di analisi e devono essere processati in armadio di sicurezza biologico. Non aprire mai contemporaneamente cuvette di campioni diversi. Le pipette utilizzate per la preparazione dei campioni devono essere destinate esclusivamente a questo scopo.

i reagenti richiesti devono essere processati sotto un banco di lavoro a flusso d'aria laminare. I reagenti necessari per l'amplificazione devono essere preparati per l'uso in una procedura di prova. Le pipette utilizzate per i reagenti devono essere destinate esclusivamente a questo scopo. Utilizzare solo pipette a spostamento positivo o con puntali provvisti di filtro. I puntali delle pipette devono essere sterili e privi di DNAsi, RNAsi, DNA e RNA.

Per evitare contaminazioni, manipolare i prodotti di amplificazione in modo da evitarne il più possibile la diffusione nell'ambiente. Le pipette utilizzate per i prodotti di amplificazione devono essere destinate esclusivamente a questo scopo.

## **8. Raccolta e conservazione dei campioni**

### **8.1 Preparazione del DNA da campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL)**

Per l'isolamento del DNA dal BAL, si devono utilizzare campioni conservati secondo le linee guida di laboratorio, ma non conservati o trasportati per più di 24 ore dopo il prelievo. I campioni trasportati e/o conservati per più di 24 ore devono essere conservati per un massimo di 72 ore tra +2 °C e +8 °C. I campioni conservati per più di 72 ore devono essere mantenuti a -70 °C.<sup>9</sup>

Si raccomanda di produrre aliquote dei campioni per evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti. I campioni congelati devono essere scongelati immediatamente prima dell'estrazione per evitare la degradazione dell'acido nucleico.

Per la preparazione del DNA da campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) si raccomanda un kit di estrazione dell'acido nucleico reperibile in commercio (come ad esempio RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema di estrazione dell'acido nucleico (come Maxwell® RSC [Promega]). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA®GENE CAP Bac contiene un **Internal Control DNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti, e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato soltanto come controllo di inibizione, oppure come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

Se l'**Internal Control DNA** viene utilizzato solo come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere tabella 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene utilizzato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µl di **Internal Control DNA**. L'**Internal Control DNA** deve essere aggiunto alla miscela del tampone di lisì del campione e **non** direttamente al materiale del campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control DNA** per reazione alla PCR Mix, sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

L'aggiunta di un ulteriore 10 % di volume alla Master Mix è consigliata per compensare la perdita della pipetta (vedere Tabella 3, Tabella 4). Prima dell'uso, scongelare, miscelare e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Control**, il **No Template Control**, e l'**Internal Control DNA**. Raffreddare tutti i reagenti durante le fasi di lavoro (2 - 8 °C).

**Tabella 3:** Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (estrazione di ICD e controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Complessivamente</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

**Tabella 4:** Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (ICD solo come controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10 %)
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>Complessivamente</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

## 9.2 Preparazione della PCR Mix

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

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

**Avvertenze:** **Si consiglia di pipettare 1 µl di Internal Control DNA nella PCR Mix per il controllo negativo quando si utilizza Internal Control DNA come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.**

**Campioni:** Pipettare 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

**Controllo positivo:** Pipettare 5 µl del **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** **Si consiglia di pipettare 1 µl di Internal Control DNA nella PCR Mix per il controllo positivo quando si utilizza il Internal Control DNA come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.**

Chiudere le cuvette o le piastre di reazione, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire nel dispositivo per PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni del dispositivo (vedere Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7, Tabella 8).

### **9.3 Impostazione dello strumento per PCR**

#### **9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA**

**Tabella 5:** Profilo PCR real-time del DNA per la serie LightCycler® Rotor-Gene Q, RIDA®CYCLER

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

**Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.**

**Tabella 6:** Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500 e 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

**Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.**

### 9.3.2 Profilo per PCR real-time universale

**Avvertenze:** Il profilo PCR real-time universale per i test del DNA deve essere utilizzato solo se i test PCR real-time RIDA<sup>®</sup>GENE DNA e RIDA<sup>®</sup>GENE RNA sono combinati in un'unica esecuzione.

**Tabella 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler<sup>®</sup> e RIDA<sup>®</sup>CYCLER

<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

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

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

<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

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tabella 9:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Dispositivo per PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Verde	-
	ICD	Giallo	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Arancione	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rosso	
Roche LightCycler® 480II	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	533/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	610/670	
Agilent Technologies Mx3005P	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Impostare il colorante di riferimento su none (nessuno).
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su nessuno.
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	ROX	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Verde	Il guadagno deve essere impostato su 5 (impostazione predefinita) per tutti i canali.
	ICD	Giallo	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Arancione	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rosso	

## 10. Controllo qualità

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi del dispositivo per PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere la Tabella 10, Figura 1, Figura 2 e Figura 3).

Il **Positive Control** arriva a una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu\text{l}$ . Viene utilizzato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie in ogni esecuzione di PCR.

**Tabella 10:** Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct ICD	Gene Ct target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct >20	0

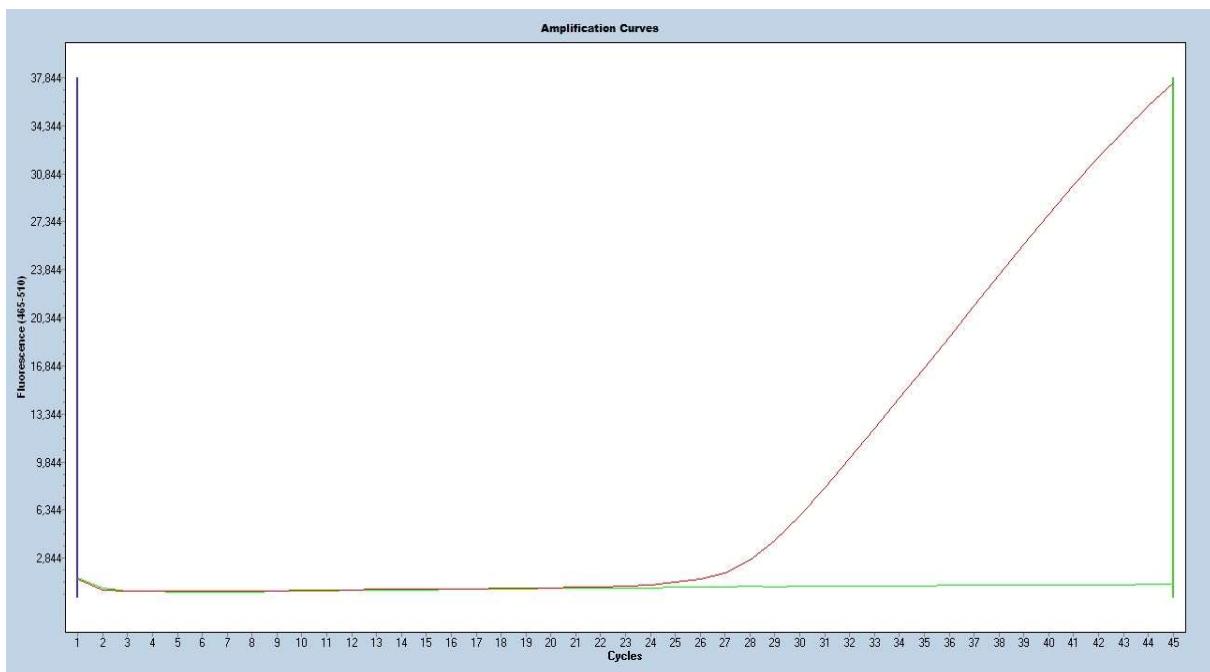
\*1 *Un valore Ct per l'ICD Non è essenziale per ottenere un risultato positivo per il controllo positivo.*

Se il controllo positivo non rientra nell'intervallo Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, tutte le reazioni devono essere rianalizzate, compresi i controlli.

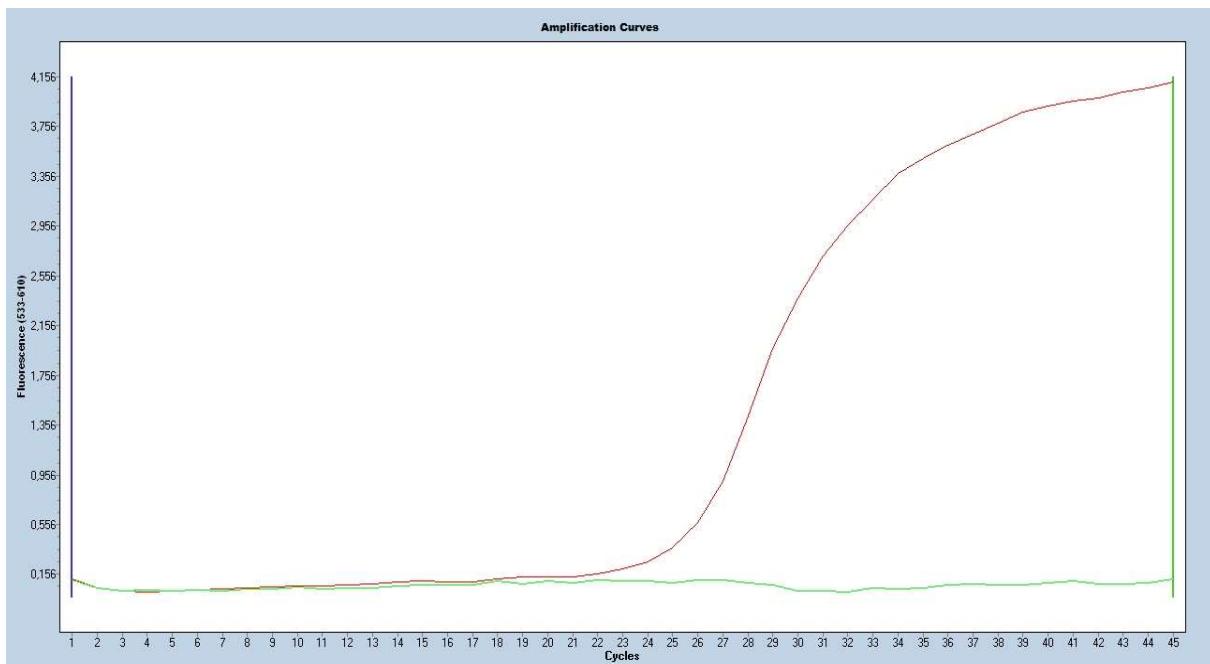
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, tutte le reazioni devono essere rianalizzate, compresi i controlli.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

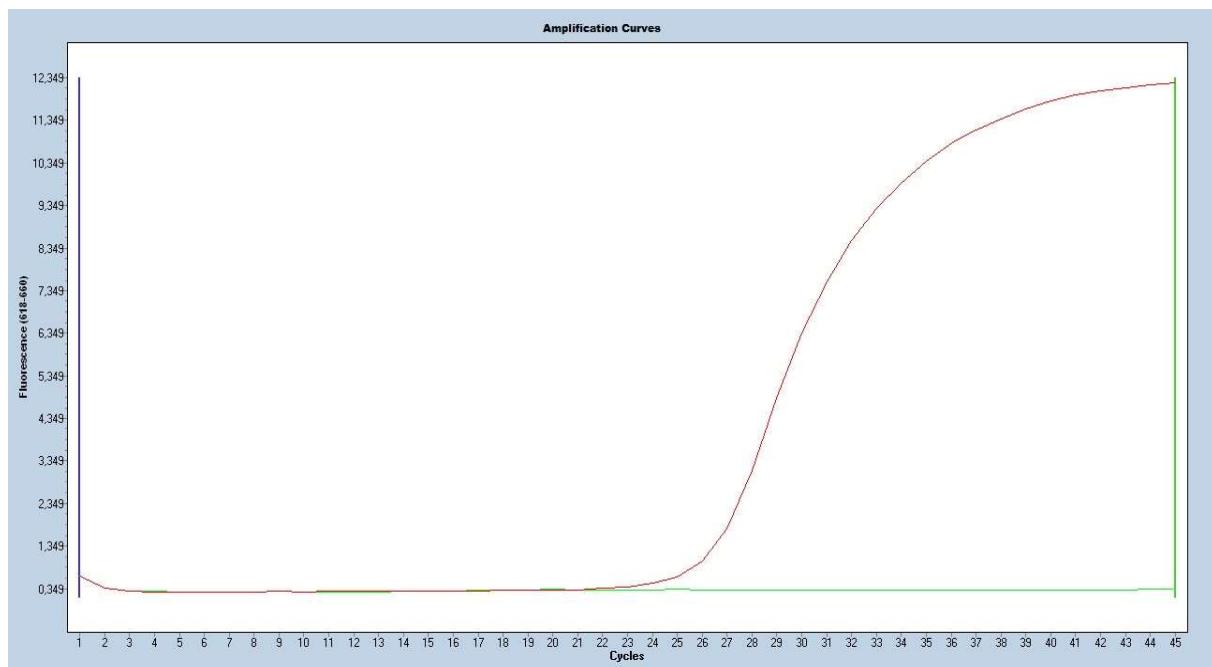
- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dei dispositivi utilizzati
- Correttezza della procedura di esecuzione del test



**Figura 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Chlamydophila pneumoniae*) su LightCycler® 480II



**Figura 2:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Legionella pneumophila*) su LightCycler® 480II



**Figura 3:** Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Mycoplasma pneumoniae*) su LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tabella 11:** Interpretazione del campione

Rivelazione di				
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Risultato
<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae</i> individuato
Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>L. pneumophila</i> individuato
Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	Positivo/ Negativo	<i>M. pneumoniae</i> individuato
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae e</i> <i>L. pneumophila</i> individuati
<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae e</i> <i>M. pneumoniae</i> individuati
Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Positivo/ Negativo	<i>L. pneumophila e</i> <i>M. pneumoniae</i> individuati
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae,</i> <i>L. pneumophila,</i> e <i>M. pneumoniae</i> individuati
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	Geni target non individuati
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Negativo</b>	Non valido

Un campione viene valutato positivo se il DNA del campione e l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è valutato positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma non è possibile trovare alcun segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione per l'**Internal Control DNA**. In questo caso non è necessario rilevare l'**Internal Control DNA** perché elevate concentrazioni dell'amplicone possono causare un segnale debole o assente dell'**Internal Control DNA**.

Un campione viene valutato negativo se il DNA del campione non mostra un segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione si può individuare un segnale di amplificazione per l'**Internal Control DNA**. Un'inibizione della reazione PCR può essere esclusa dalla rivelazione dell'**Internal Control DNA**.

Un campione non è valido se il DNA del campione e l'**Internal Control DNA** non mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione

contiene inibitori della PCR nel campione o si è verificato un errore durante il processo di estrazione. Il campione estratto deve essere diluito 1:10 con acqua per PCR e nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

## 12. Limiti del metodo

1. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è valido solo per il lavaggio broncoalveolare (BAL).
3. La presenza di inibitori della PCR può condurre a risultati non valutabili.
4. I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono da procedure di identificazione, estrazione, trasporto, conservazione e manipolazione del campione adeguate. Pertanto è fondamentale eseguire queste operazioni con attenzione e seguire le istruzioni fornite dal fabbricante dei prodotti per l'estrazione dell'acido nucleico. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
5. L'uso di questo prodotto richiede indumenti da lavoro e aree di lavoro adatte alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente infettivi e preparati chimici classificati come pericolosi al fine di prevenire incidenti con possibili gravi conseguenze per l'utente e altri soggetti.
6. Questo prodotto deve essere utilizzato solo da personale qualificato e adeguatamente formato nello svolgimento di procedure biologiche molecolari quali estrazione, amplificazione e rivelazione di acidi nucleici. Questa disposizione è tesa ad evitare risultati errati.
7. Per il trattamento manuale, assicurarsi che la preparazione/l'estrazione del campione, la preparazione della PCR e la PCR avvengano in locali separati per evitare risultati falsi positivi.
8. Per la processazione manuale gli indumenti e gli strumenti per la preparazione/l'estrazione del campione, la preparazione della PCR e la PCR devono essere separati, al fine di evitare risultati falsi positivi durante l'uso del prodotto.
9. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD), possono essere rivelati, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
10. Eventuali mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute, e possono produrre risultati falsi negativi utilizzando RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac.
11. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD), possono essere rivelati, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.

12. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target (*Chlamydophila pneumoniae* (16S-rRNA), *Legionella pneumophila* (16S-rRNA), e *Mycoplasma pneumoniae* (IGS)).
13. Le sostanze paracodeina, ciprofloxacina e guaifenesina/destrometorfano possono manifestare proprietà interferenti anche in piccole quantità.

### 13. Prestazioni e caratteristiche

#### 13.1 Prestazioni cliniche

Il test PCR real-time multiplex RIDA®GENE CAP Bac è stato confrontato in un laboratorio esterno con il metodo del test PCR real-time patogeno-specifico del laboratorio stesso (analoghi ai metodi di test PCR accreditati secondo DIN EN ISO 15189:2007) utilizzando LightCycler® 480 II e LightCycler® 2.0. Complessivamente, sono stati testati 282 campioni di ritenzione di estratti di acido nucleico da materiale di test clinici respiratori (BAL). 17 campioni (6%) hanno dato un risultato non valido dovuto alla rivelazione negativa del DNA di controllo interno; questo indica una rivelazione sensibile dei risultati degli inibitori da parte del test RIDA®GENE CAP Bac. Questi campioni non sono stati inclusi nella valutazione.

I risultati dei singoli patogeni sono mostrati nelle Tabelle da 12 a 14:

**Tabella 12:** Rivelazione di *Chlamydia pneumoniae* (CP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>C. pneumoniae</i>		Complessivamente
		Positivo	Negativo	
<b>Test interno CP</b>	Positivo	30	0	30
	Negativo	0	235	235
Complessivamente		30	235	265

Sensibilità	100,0 %
Specificità	100,0 %
PPV	100,0 %
NPV	100,0 %

**Tabella 13:** Rivelazione di *Mycoplasma pneumoniae* (MP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>M. pneumoniae</i>		Complessivamente
		Positivo	Negativo	
<b>Test interno</b> MP	Positivo	50	0	50
	Negativo	0	215	215
Complessivamente		50	215	265

Sensibilità	100,0 %
Specificità	100,0 %
PPV	100,0 %
NPV	100,0 %

**Tabella 14:** Rivelazione di *Legionella pneumophila* (LP)

		RIDA®GENE CAP Bac – <i>L. pneumophila</i>		Complessivamente
		Positivo	Negativo	
<b>Test interno</b> LP	Positivo	50	0	50
	Negativo	5	210	215
Complessivamente		55	210	265

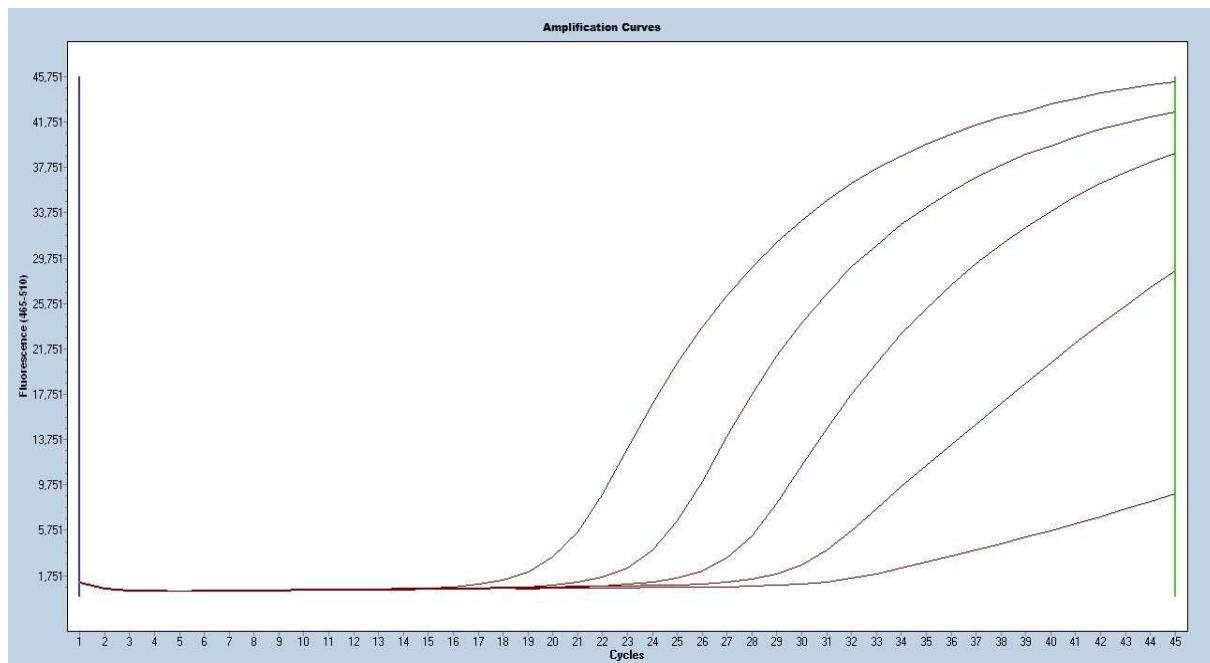
  

Sensibilità	100,0 %
Specificità	97,7 %
PPV	90,9 %
NPV	100,0 %

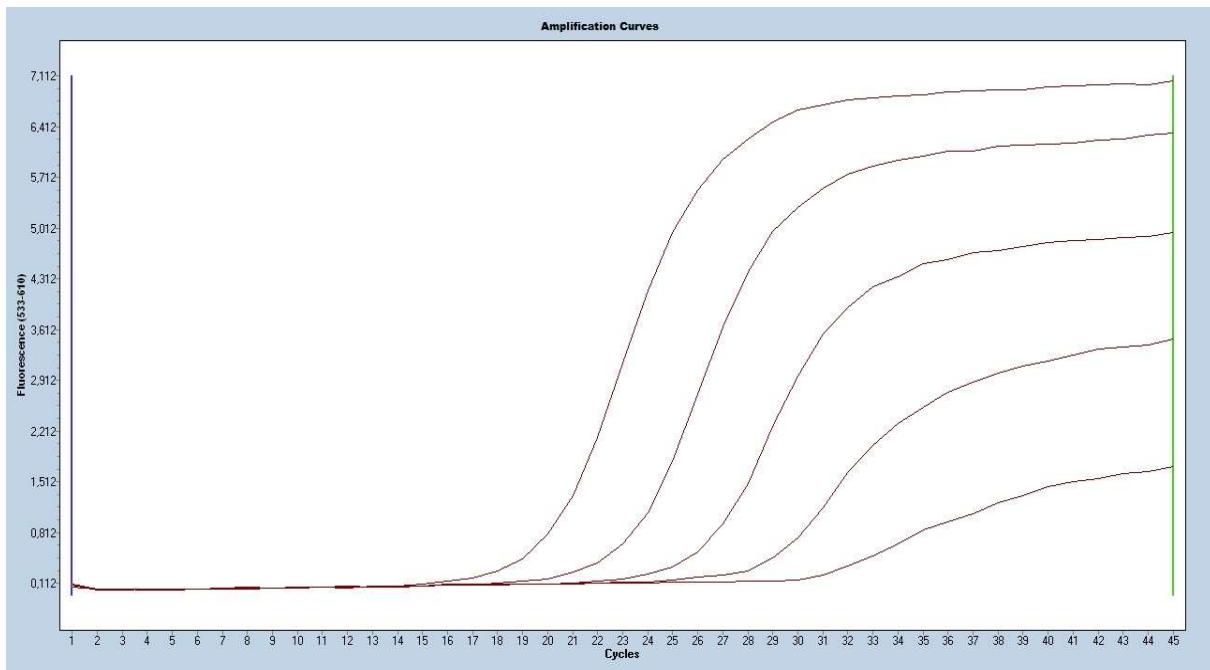
## 13.2 Sensibilità analitica

Il test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac ha a limite di rivelazione di  $\geq 50$  copie di DNA per reazione per *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae*.

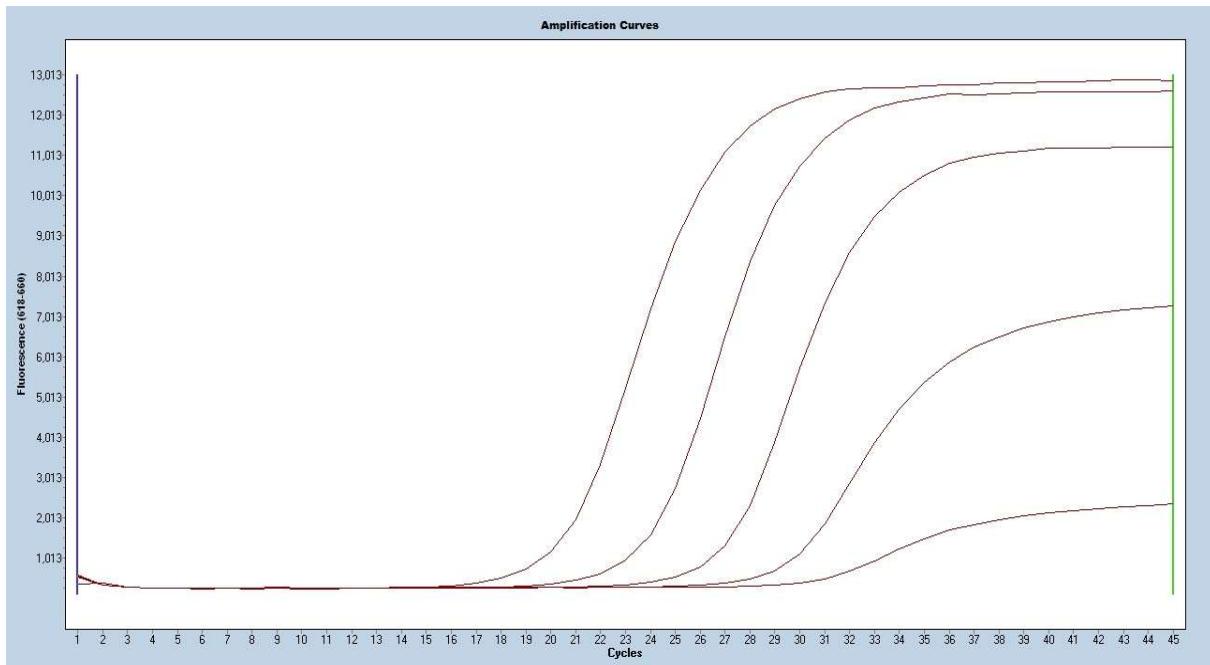
Le Figure 4, 5, e 6 mostrano serie di diluizioni di *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae* (ognuna da  $5 \times 10^5$  a  $10^1$  copie di DNA/reazione) su LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Figura 4:** Serie di diluizioni di *Chlamydophila pneumoniae* (da  $5 \times 10^5$  a  $10^1$  copie di DNA/reazione) su LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Figura 5:** Serie di diluizioni di *Legionella pneumophila* (da  $5 \times 10^5$  a  $10^1$  di copie di DNA/reazione) su LightCycler® 480II



**Figura 6:** Serie di diluizioni di *Mycoplasma pneumoniae* (da  $5 \times 10^5$  a  $10^1$  copie di DNA/reazione) su LightCycler® 480II

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dal contenuto di DNA.

### 13.3 Specificità analitica

Il test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac è specifico per *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae*. Non sono state rivelate reattività crociata con le seguenti specie (vedere Tabella 12):

**Tabella 15:** Test di reattività crociata

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

### 13.4 Reattività analitica

La reattività del test PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac è stata studiata utilizzando sierogruppi di *Legionella pneumophila* (vedere Tabella 13). I sierogruppi di *Legionella pneumophila* testati sono stati rivelati utilizzando il PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE CAP Bac.

**Tabella 16:** Test di reattività analitica

Legionella pneumophila					
Sierogruppo 1	+	Sierogruppo 6	+	Sierogruppo 11	+
Sierogruppo 2	+	Sierogruppo 7	+	Sierogruppo 12	+
Sierogruppo 3	+	Sierogruppo 8	+	Sierogruppo 13	+
Sierogruppo 4	+	Sierogruppo 9	+	Sierogruppo 14	+
Sierogruppo 5	+	Sierogruppo 10			

### 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-09-10	Versione di rilascio

### 15. Descrizione dei simboli

#### Simboli generali

<b>IVD</b>	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
<b>LOT</b>	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
<b>REF</b>	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

## Simboli specifici del test

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Bibliografia

1. Höffken *et al.* [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. Pneumologie. 2009; 63:e1-68.
2. Ramirez *et al.* Changing needs of community-acquired pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011. 66 Suppl 3:iii3-9.
3. 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.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Mycoplasma pneumoniae* Infections. 2018.  
<https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>. Accessed: 14.08.2019.
5. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Chlamydiosen (Teil 2): Erkrankungen durch Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae und Simkania negevensis. 2010. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Chlamydiosen\\_Teil2.html#doc2382910bodyText15](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil2.html#doc2382910bodyText15). Accessed: 15.08.2019
6. Sharma L. *et al.* Atypical Pneumonia: Updates on Legionella, Chlamydophila, and Mycoplasma Pneumonia. Clin Chest Med. 2017. 38 (1):45-58.
7. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
8. Robert-Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber. Legionellose. 2019.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Legionellos\\_e.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Legionellos_e.html). Accessed: 01.10.2019
9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for

Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.