

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 *Chlamydomphila 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 *Chlamydomphila 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 %.¹ 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 *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*).²

Bis zu 20 % der ambulant erworbenen Pneumonien werden durch *M. pneumoniae* ausgelöst.³ *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.⁴

Chlamydomphila pneumoniae ist ein gram-negatives Bakterium und wird meist aerogen übertragen.⁵ Eine Infektion mit *C. pneumoniae* ist meist hartnäckig aber mild.^{5,6} 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.^{1,5} 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 Erregernachweis sicher aus respiratorischen Proben oder Gewebe gelingen.⁵

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.⁷ 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).⁸

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE CAP Bac ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae* in humaner bronchoalveolärer Lavage (BAL). Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Chlamydomphila 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 Reaktionsgefäße 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.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und des LightCycler® 480 z
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße 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. Brennbares 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.

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.⁹

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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

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	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
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (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.**

Reaktionsgefäße 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/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 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 *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**1 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

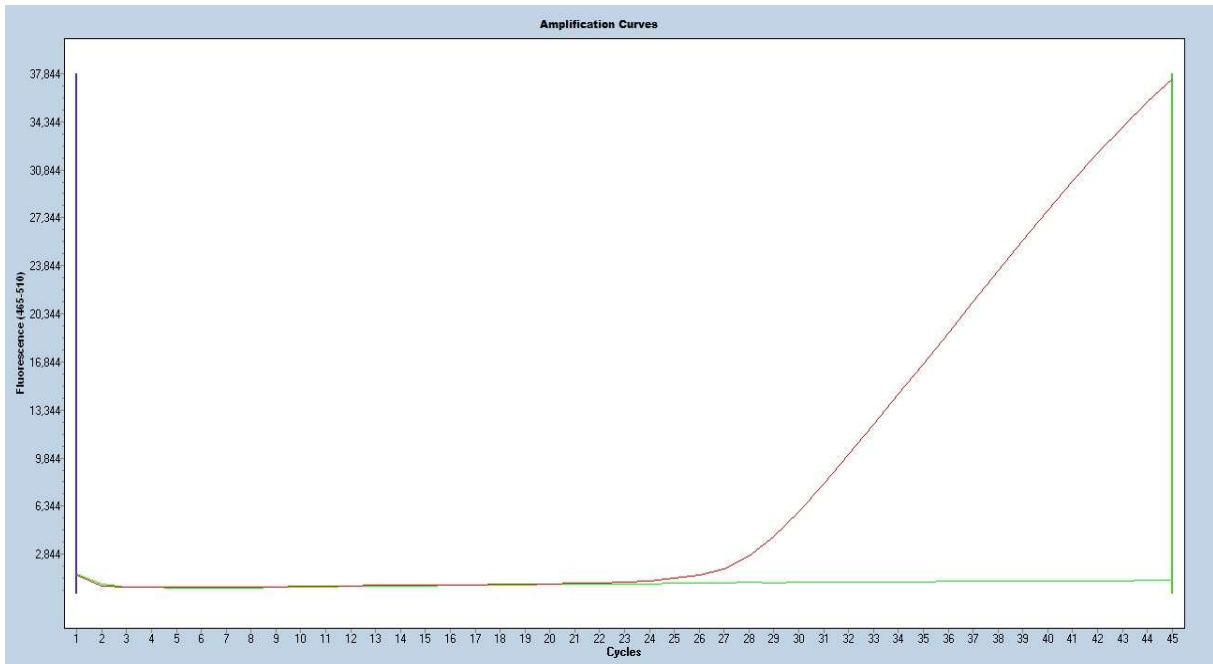


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Chlamydomonas pneumoniae*) auf dem LightCycler® 480II

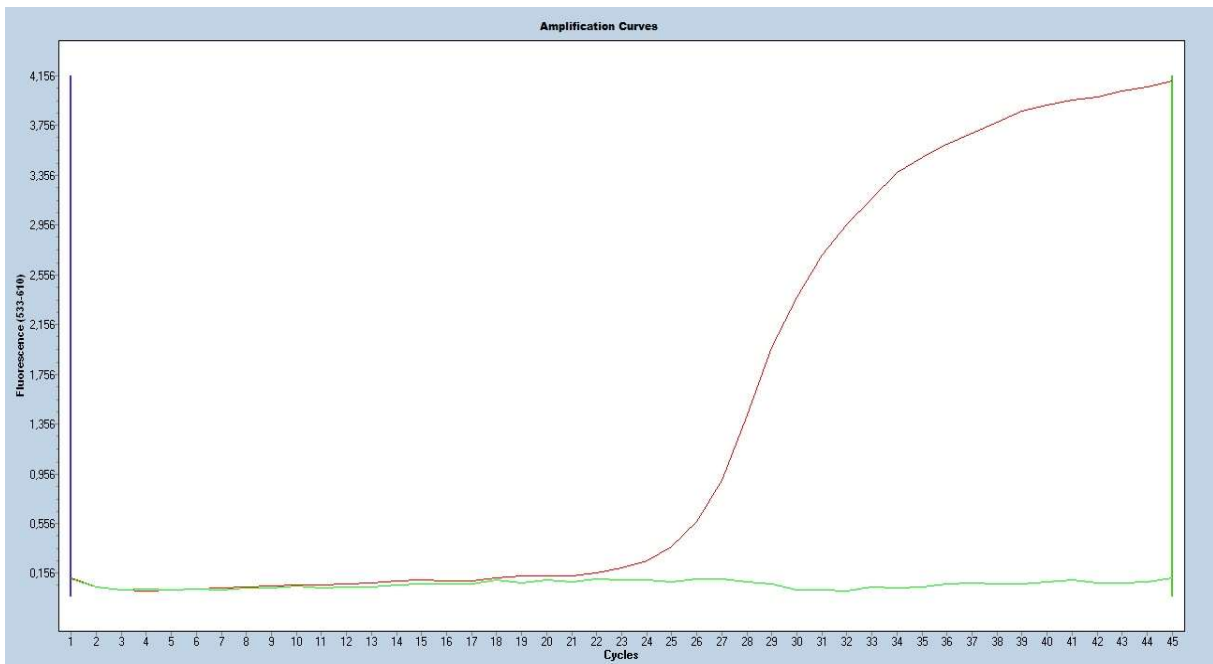


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Legionella pneumophila*) auf dem LightCycler® 480II

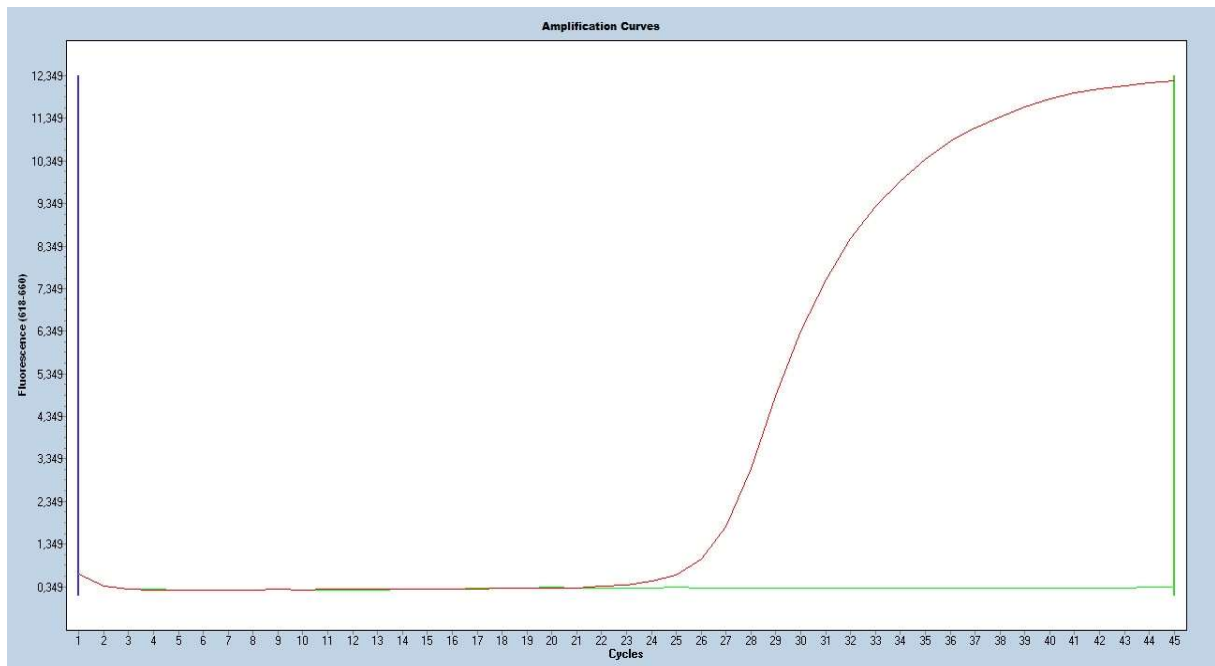


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Mycoplasma pneumoniae*) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

Tab. 11: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von			ICD	Ergebnis
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
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</i> und <i>L. pneumophila</i> nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>C. pneumoniae</i> und <i>M. pneumoniae</i> nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>L. pneumophila</i> und <i>M. pneumoniae</i> nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>C. pneumoniae</i> , <i>L. pneumophila</i> und <i>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 bronchoalveoläre 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 ernststen 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®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®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® 480 II bzw. LightCycler® 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®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
		positiv	negativ	
In-house CP	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
		positiv	negativ	
In-house MP	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
		positiv	negativ	
In-house LP	positiv	50	0	50
	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 ≥ 50 DNA-Kopien / Reaktion für *Chlamydomonas pneumoniae*, *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae*.

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

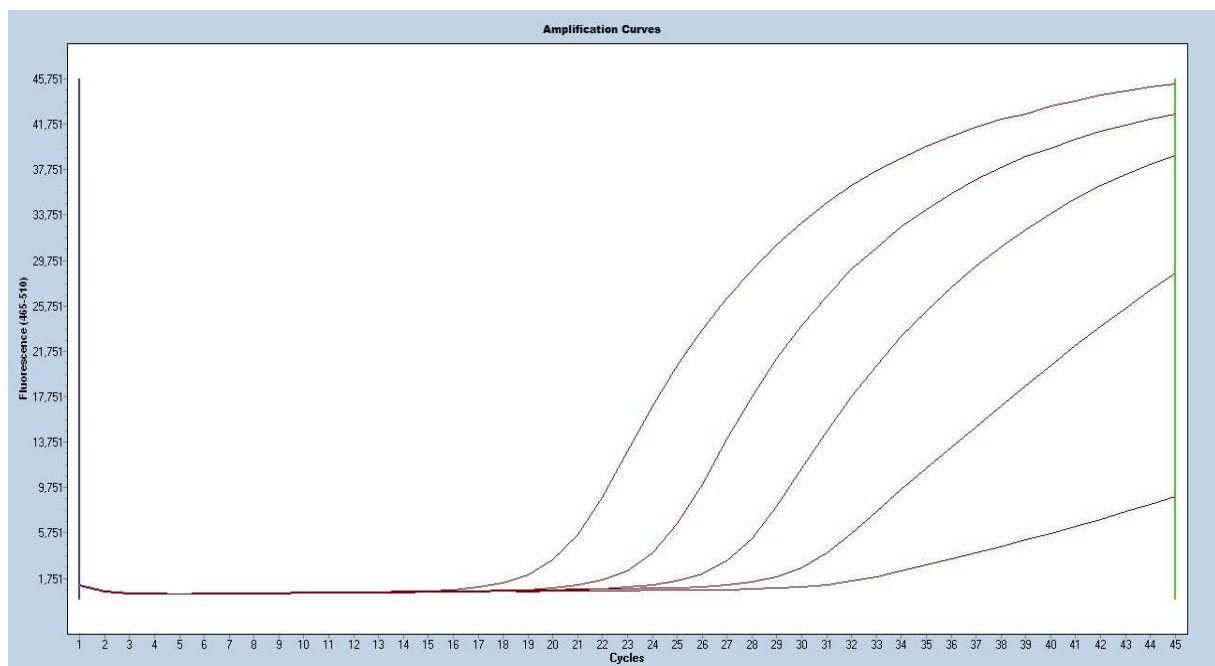


Abb. 4: Verdünnungsreihe *Chlamydomonas pneumoniae* ($5 \times 10^5 - 10^1$ DNA Kopien /Reaktion) auf dem LightCycler® 480II

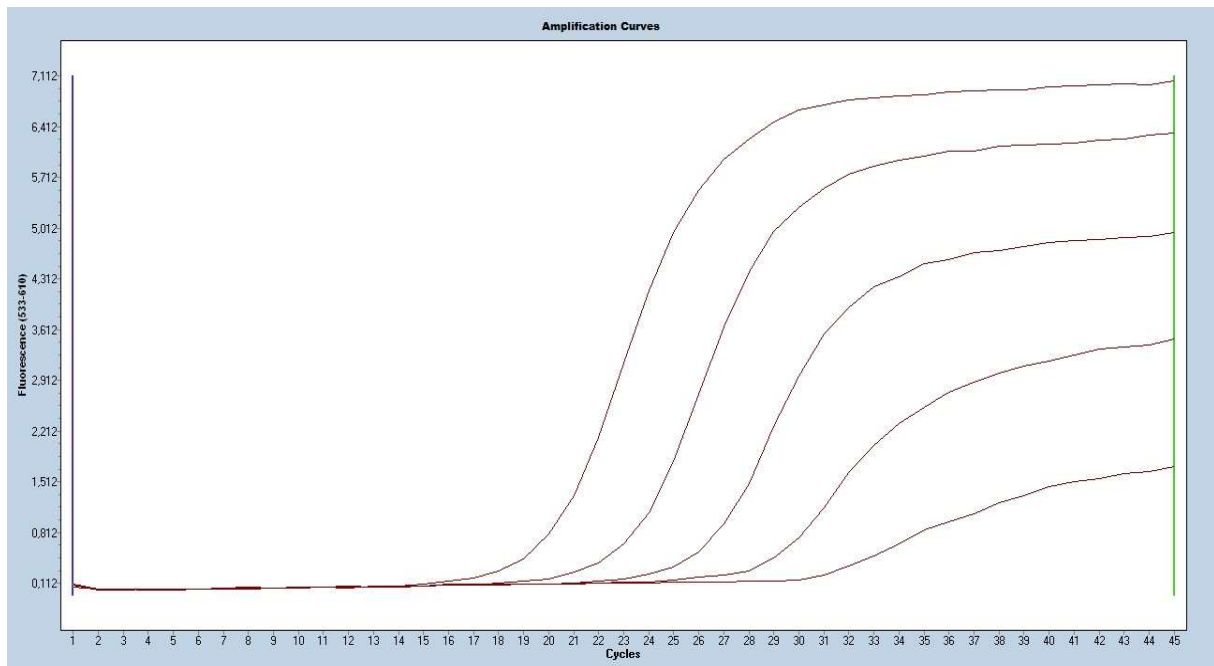


Abb. 5: Verdünnungsreihe *Legionella pneumophila* (5×10^5 - 10^1 DNA Kopien /Reaktion) auf dem LightCycler® 480II

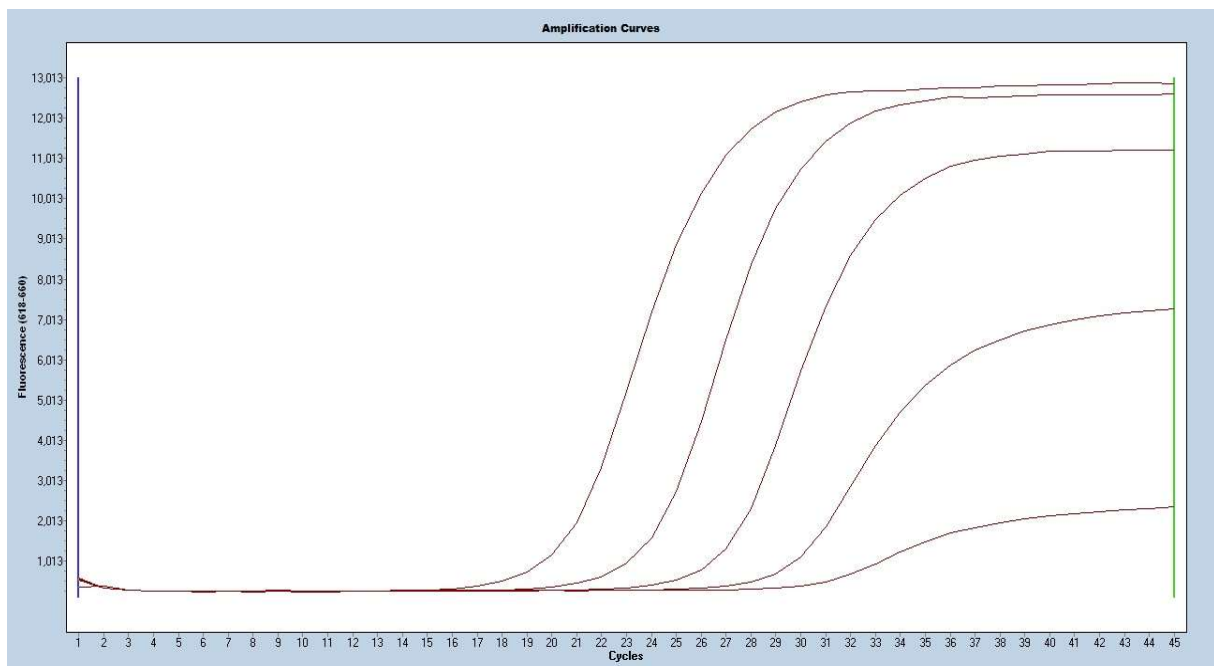


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Mycoplasma pneumoniae* (5×10^5 - 10^1 DNA Kopien /Reaktion) auf dem LightCycler® 480II

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 *Chlamydomophila 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 bozemanii</i>	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Legionella longbeacheae</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Herpes simplex virus 1, strain McIntyre	-	<i>Mycoplasma fermentas</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 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










<i>Legionella pneumophila</i>					
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

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-09-10	Freigabeversion

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	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. 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. 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.