

RIDA® GENE CAP Bac

REF PG2705



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemania
Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0, Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



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

M. pneumoniae es causante de hasta el 20 % de los casos ambulatorios de neumonía.³ *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.⁴

Chlamydomphila pneumoniae es una bacteria gramnegativa que por lo general se transmite a través del aire.⁵ Una infección con *C. pneumoniae* suele ser difícil de superar, pero es leve.^{5,6} 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*.^{1,5} 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.⁵

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.⁷ 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 legionelosis).⁸

3. Principio del ensayo

RIDA[®]GENE CAP Bac es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa de *Chlamydomphila 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 *Chlamydomphila 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.

- 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.

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.⁹

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 búfer 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**. Refrigerere 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
	Total	20 µl	220 µl

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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

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
R-Biopharm RIDA® CYCLER	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Verde	-
	ICD	Amarillo	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Naranja	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rojo	
Roche LightCycler® 480II	<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	
Roche LightCycler® 480 z	<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	
Agilent Technologies Mx3005P	<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	
ABI 7500	<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	
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	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/ μ l. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 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

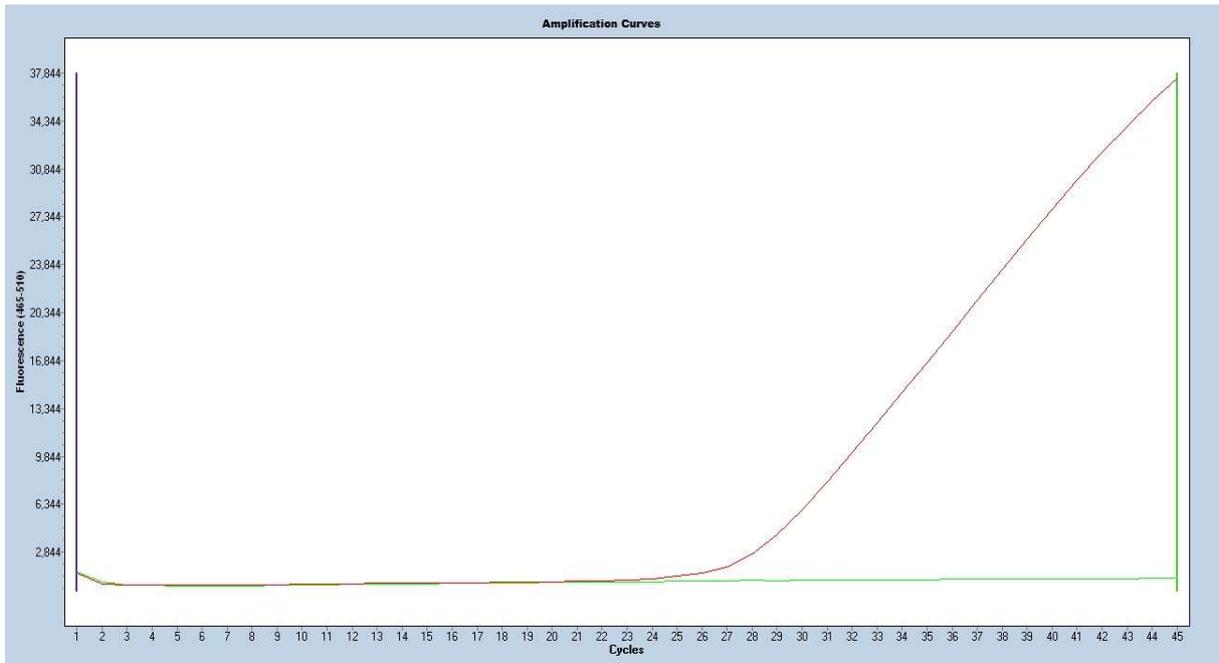


Figura 1: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Chlamydomonas reinhardtii*) en el LightCycler® 480II

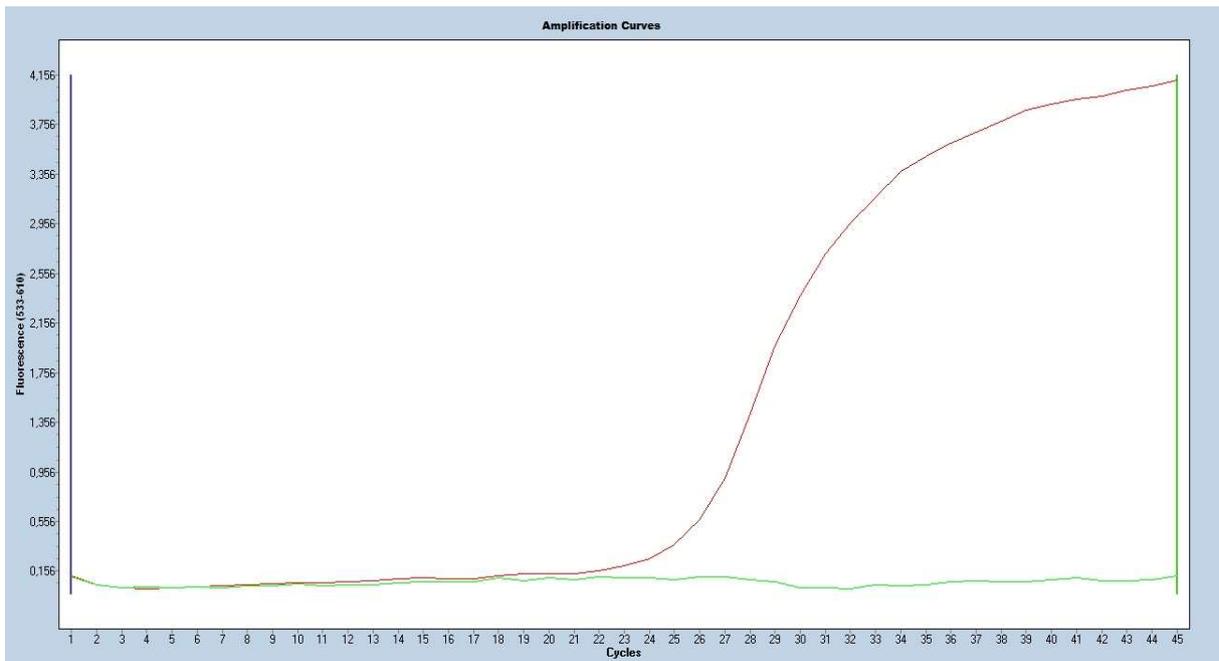


Figura 2: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Legionella pneumophila*) en el LightCycler® 480II

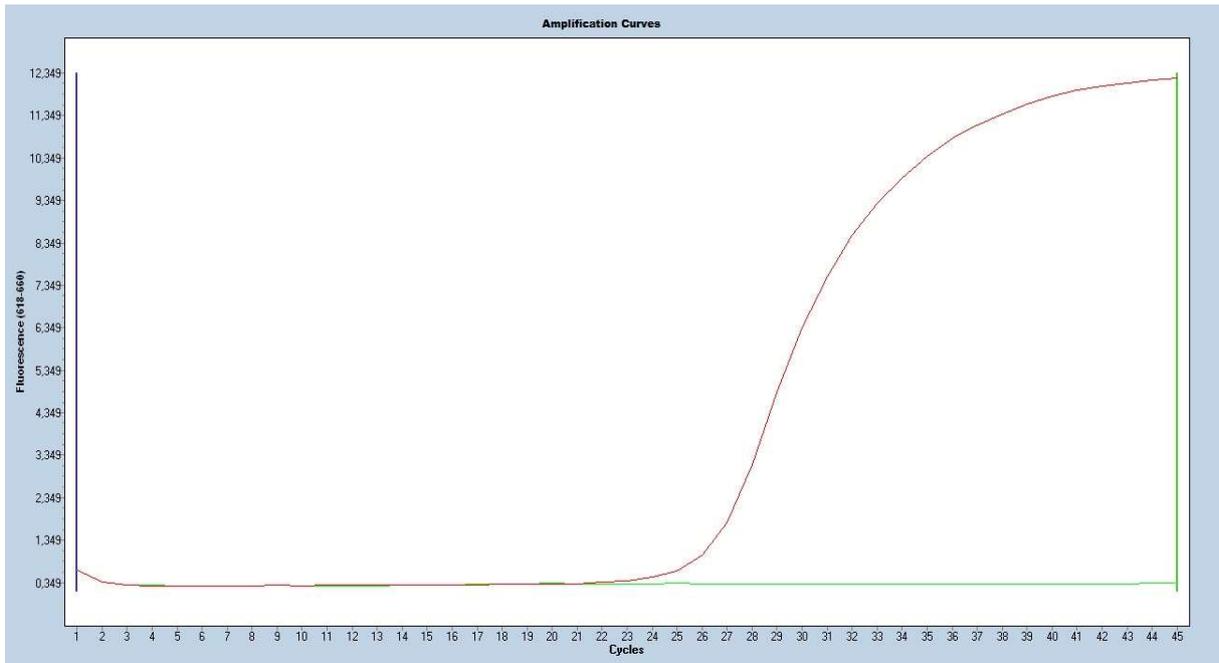


Figura 3: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Mycoplasma pneumoniae*) en el LightCycler® 480II

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			ICD	Resultado
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
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®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®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® 480 II y LightCycler® 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®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
		Positivo	Negativo	
Interno CP	Positivo	30	0	30
	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
		Positivo	Negativo	
Interno MP	Positivo	50	0	50
	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
		Positivo	Negativo	
Interno LP	Positivo	50	0	50
	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 ≥ 50 copias de ADN por reacción para *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae*.

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

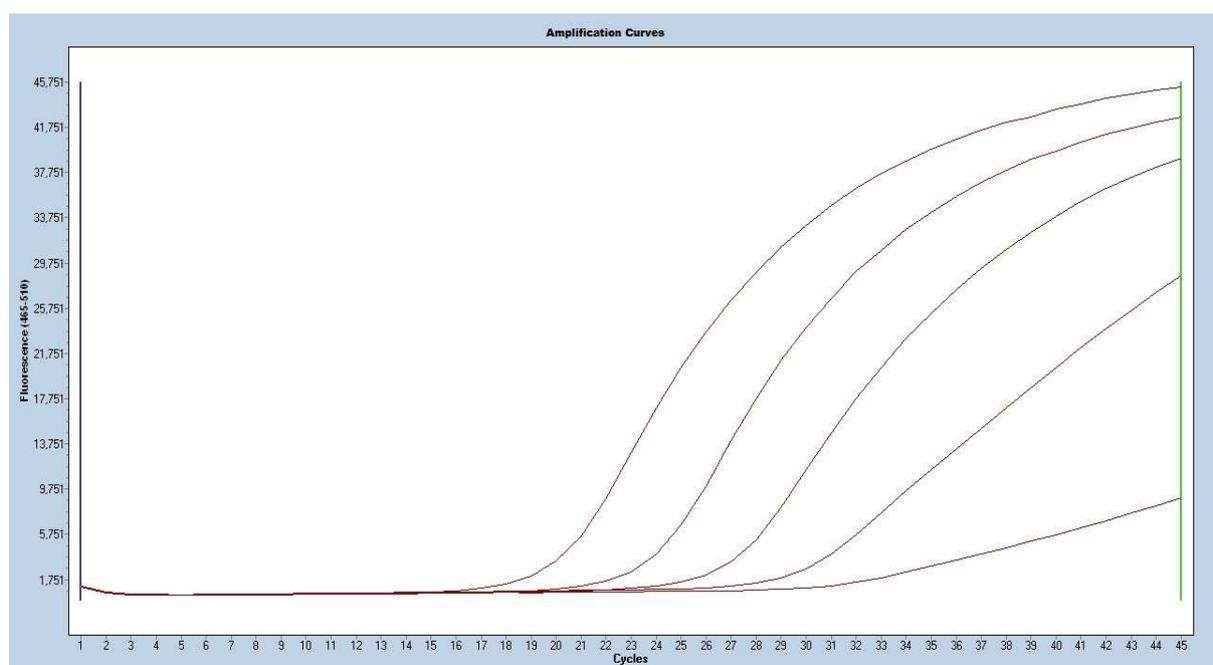


Figura 4: Dilución seriada de *Chlamydomphila pneumoniae* (5×10^5 a 10^1 copias de ADN/reacción) en el LightCycler® 480II

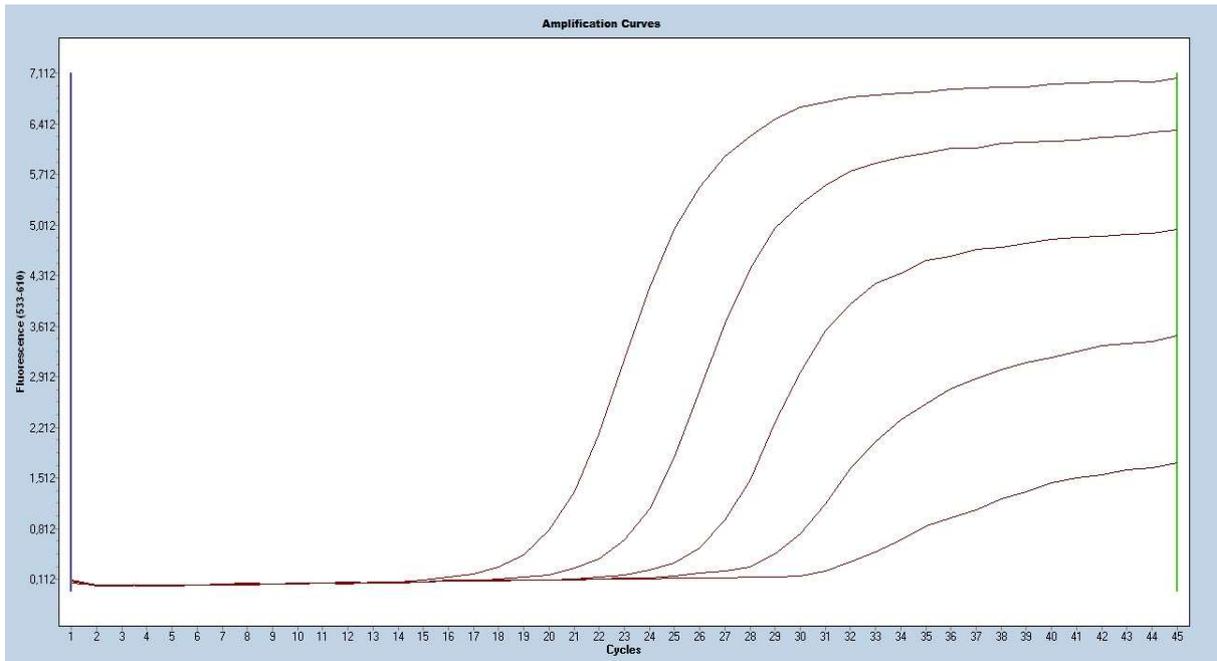


Figura 5: Dilución seriada de *Legionella pneumophila* (5×10^5 a 10^1 copias de ADN/reacción) en el LightCycler® 480II

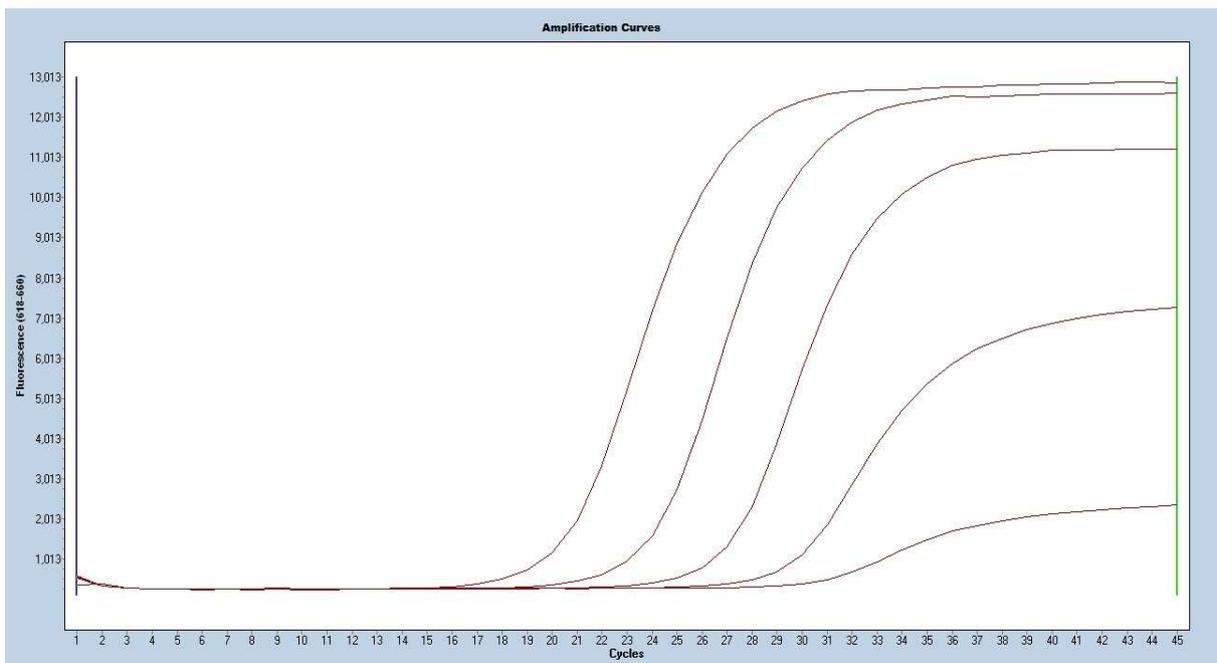


Figura 6: Dilución seriada de *Mycoplasma pneumoniae* (5×10^5 a 10^1 copias de ADN/reacción) en el LightCycler® 480II

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®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

<i>Legionella pneumophila</i>					
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

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	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. 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.