

RIDA® GENE CAP Bac

REF PG2705



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



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.¹ 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*).²

Fino al 20% delle polmoniti ambulatoriali ha come fattore scatenante *M. pneumoniae*.³ *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.⁴ *Chlamydophila pneumoniae* è un batterio Gram-negativo e viene generalmente trasmesso attraverso l'aria.⁵ Un'infezione da *C. pneumoniae* è generalmente difficile da superare, ma lieve.^{5,6} 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*.^{1,5} 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.⁵

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.⁷ 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).⁸

3. Principio del test

RIDA®GENE CAP Bac è un test PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta di *Chlamydomphila 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 *Chlamydomphila 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/lo 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®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® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Dispositivi per PCR real-time	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 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 per verificare la compatibilità.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II e LightCycler® 480 z
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, 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.

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.⁹

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 lisi 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
	Complessivamente	20 µl	220 µl

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
	Complessivamente	21,0 µl	231,0 µl

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®GENE DNA e RIDA®GENE RNA sono combinati in un'unica esecuzione.

Tabella 7: Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler® e RIDA®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/ μ l. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 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

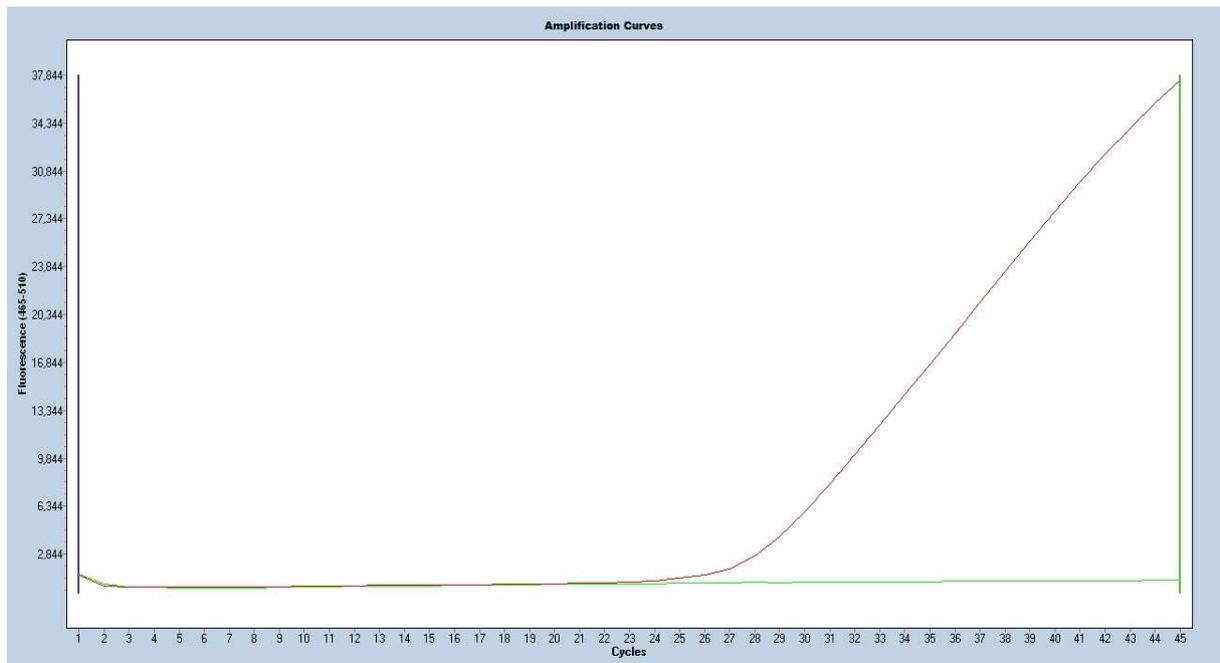


Figura 1: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Chlamydia pneumoniae*) su LightCycler® 480II

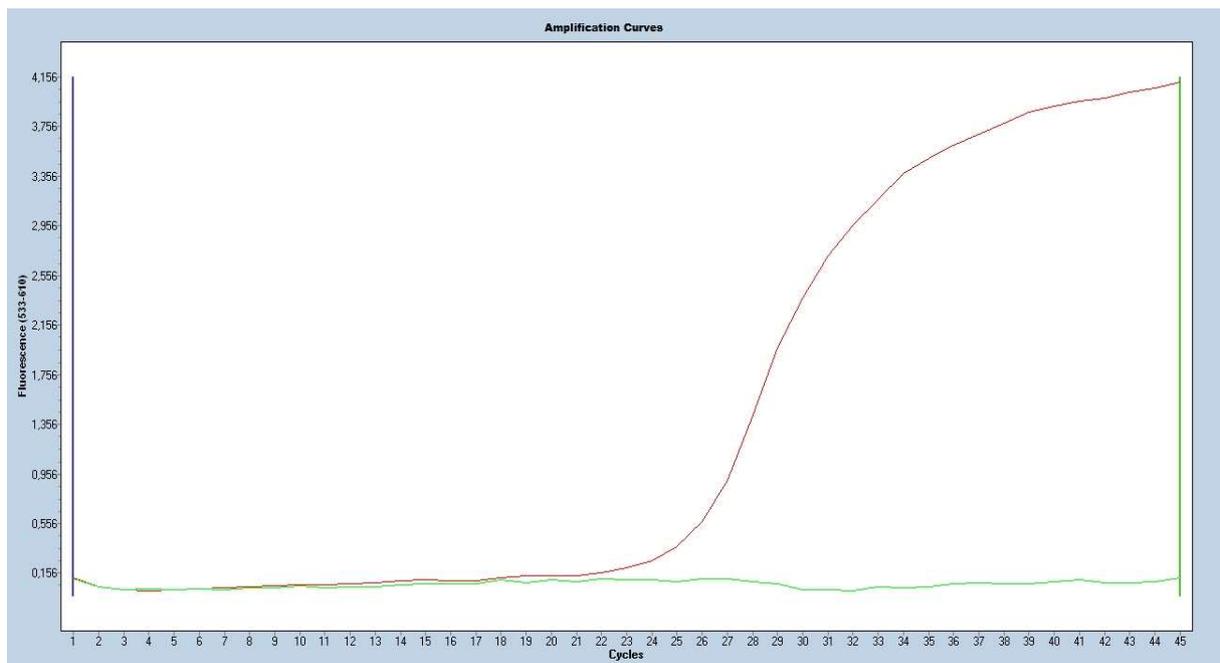


Figura 2: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Legionella pneumophila*) su LightCycler® 480II

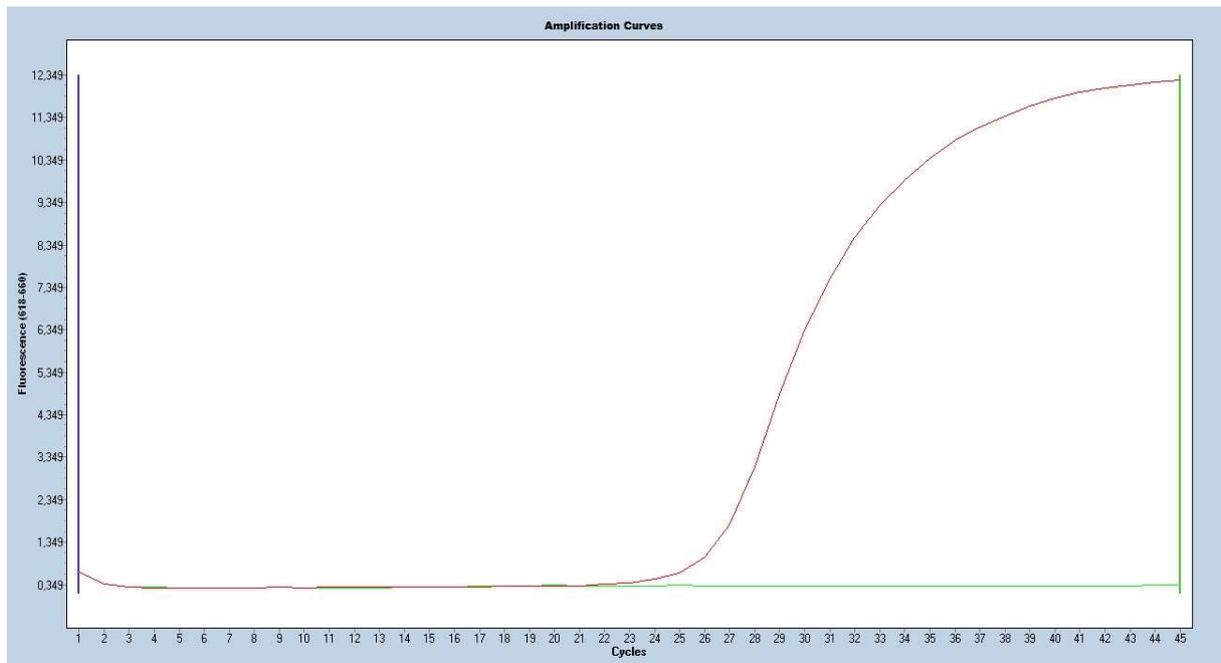


Figura 3: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Mycoplasma pneumoniae*) su LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tabella 11: Interpretazione del campione

Rivelazione di			ICD	Risultato
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae</i> individuato
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>L. pneumophila</i> individuato
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>M. pneumoniae</i> individuato
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae</i> e <i>L. pneumophila</i> individuati
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae</i> e <i>M. pneumoniae</i> individuati
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>L. pneumophila</i> e <i>M. pneumoniae</i> individuati
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>C. pneumoniae</i>, <i>L. pneumophila</i>, e <i>M. pneumoniae</i> individuati
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Geni target non individuati
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	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®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 (*Chlamydomphila 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 (analogo 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	
Test interno CP	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	
Test interno 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	
Test interno 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®GENE CAP Bac ha a limite di rivelazione di ≥ 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 5×10^5 a 10^1 copie di DNA/reazione) su LightCycler® 480II.

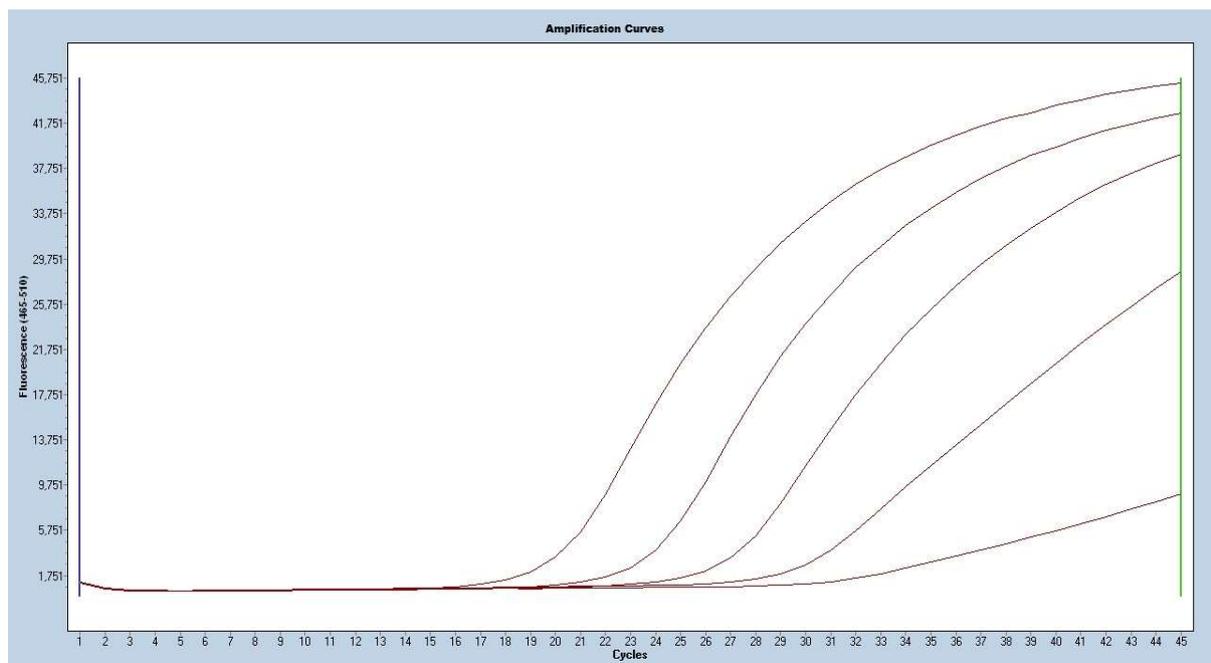


Figura 4: Serie di diluizioni di *Chlamydophila pneumoniae* (da 5×10^5 a 10^1 copie di DNA/reazione) su LightCycler® 480II

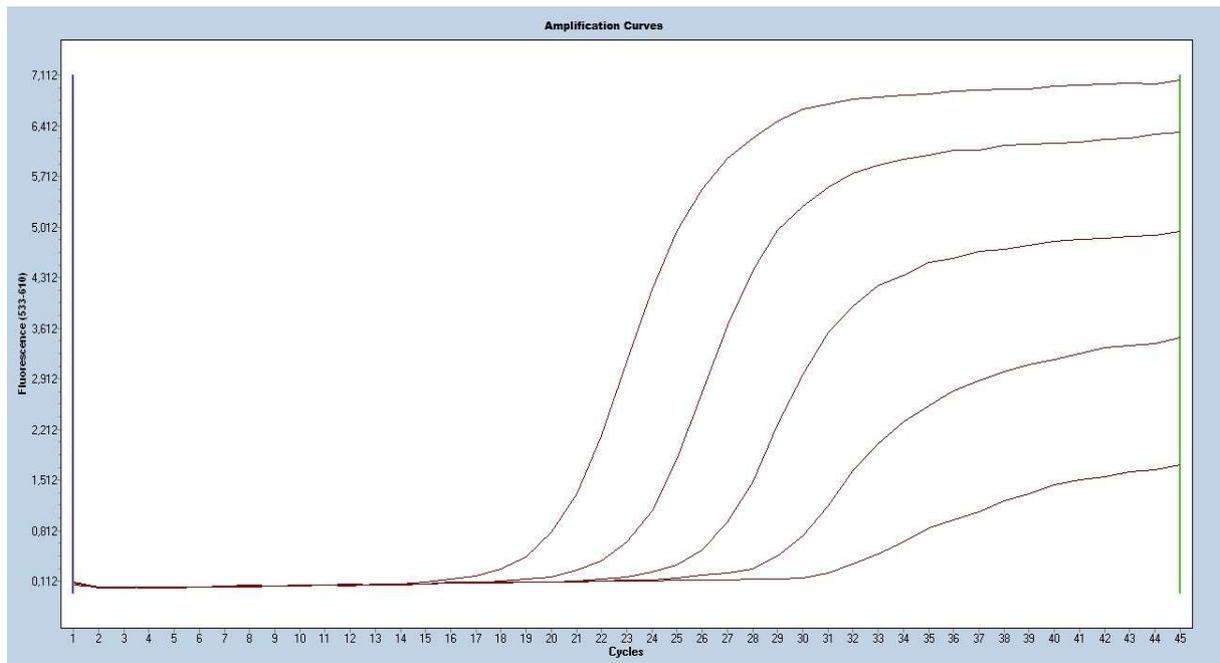


Figura 5: Serie di diluizioni di *Legionella pneumophila* (da 5×10^5 a 10^1 di copie di DNA/reazione) su LightCycler® 480II

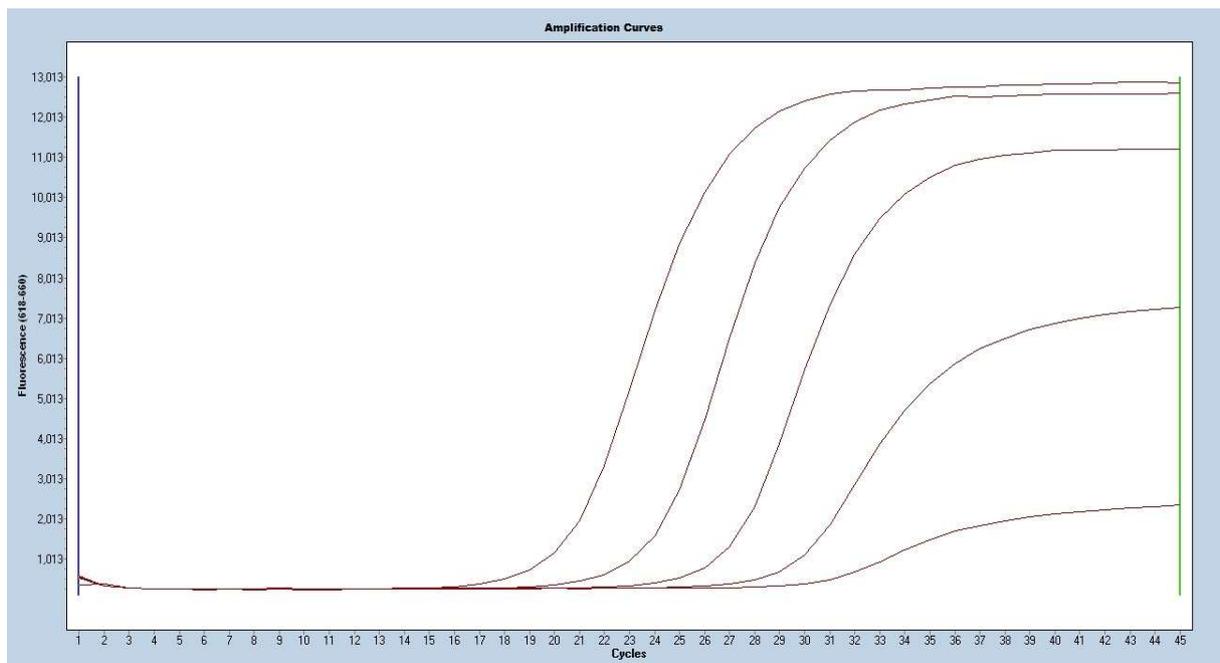


Figura 6: Serie di diluizioni di *Mycoplasma pneumoniae* (da 5×10^5 a 10^1 copie di DNA/reazione) su LightCycler® 480II

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®GENE CAP Bac è specifico per *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae*. Non sono state rivelate reattività crociate 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®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®GENE CAP Bac.

Tabella 16: Test di reattività analitica

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

14. Cronologia delle versioni

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

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

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

Simboli specifici 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. Accessed: 15.08.2019
6. Sharma L. *et al.* Atypical Pneumonia: Updates on *Legionella*, *Chlamydia*, 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.