

## RIDA® GENE Legionella

**REF** PG8005



Deutsch .....	3
English.....	21
Español.....	39
Français.....	59
Italiano .....	79

# RIDA®GENE Legionella

**REF** PG8005

## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Legionella ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. aus humaner bronchoalveolärer Lavage.

Die RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch *Legionella* verursachten Pneumonie unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

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. Legionellenerkrankungen werden zwischen ambulant-erworbenen Infektionen, reisebedingten Infektionen und nosokomialen Infektionen unterschieden. In den USA liegt die Mortalitätsrate nosokomialer Infektionen zwischen 15 - 20 %.<sup>1,2</sup> In Europa verlaufen 12 % aller Legionellen-Infektionen tödlich. Unter der großen Anzahl an *Legionellen*-Spezies sind zwei wichtige humanpathogene Spezies. Eine Infektion mit *L. pneumophila* führt hauptsächlich zur Legionärskrankheit (auch Legionellose genannt) und *L. longbeachae* verursacht Pontiac-Fieber. Pontiac-Fieber ist eine akute, selbst-limitierende Influenza-ähnliche Erkrankung, jedoch ohne das Auftreten einer Lungenentzündung. Ungefähr 7 % der mit Legionellen infizierten Patienten entwickeln das Pontiac-Fieber.<sup>3</sup>

*L. pneumophila* hat 16 Serogruppen und 70 % der *Legionellen*-Infektionen in Europa werden durch *L. pneumophila* Serogruppe 1 verursacht. Andere Spezies die zu einer *Legionellen*-Infektion führen sind unter anderem *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* und *L. longbeachae*.<sup>4</sup>

Die Legionärskrankheit ist eine akute respiratorische Infektion die in 90 % der Fälle durch *L. pneumophila* verursacht wird. Diese Erkrankung wurde 1976 in Philadelphia während einer Tagung der Amerikanischen Legion das erste Mal beschrieben. Dadurch erhielt die Legionärskrankheit seinen Namen. Zwei weitere Legionellose-Ausbrüche mit insgesamt 6 Toten wurden 2013 in Brisbane, Australien und Reynoldsburg, Ohio gemeldet. Die Symptome sind Fieber, Husten (trocken oder

sputum-produzierend) und Schüttelfrost. Andere, weniger häufig vorkommende Symptome sind Diarrhoe, Erbrechen, Bradykardie und Hyponatriämie.<sup>3</sup> Menschen in jedem Alter können sich mit *Legionellen* infizieren, aber ältere Menschen, sowie Raucher und Patienten mit chronischer Lungenerkrankung sind vermehrt anfällig für solch eine Infektion. Selbst in Ländern mit effektivem Gesundheitssystem werden 90 % der Fälle von Legionärskrankheit nicht diagnostiziert, da die klinische Präsentation sehr breit gefächert ist und die Erkrankung selten auftritt. Außerdem ist es schwer, die Legionärskrankheit nur durch Symptome oder radiologische Untersuchungen von anderen Pneumonien zu unterscheiden, so dass andere sensitive und spezifische Methoden, wie die real-time PCR, einen großen Vorteil für die Diagnose von *Legionellen*-Infektionen mit sich bringt.

### 3. Testprinzip

RIDA®GENE Legionella ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* aus humaner bronchoalveolärer Lavage. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* (16S-rRNA) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem 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 Legionella 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	<b>Reaction Mix</b>	2x	1050 µl	gelb
2	<b>Taq-Polymerase</b>	1x	80 µl	rot
D	<b>Internal Control DNA</b>	2x	1700 µl	orange
N	<b>No Template Control</b>	1x	450 µl	weiß
P	<b>Positive Control</b>	1x	200 µl	blau

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können 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 15 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 Legionella multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:

**Tab. 2:** Benötigtes Zubehör (kompatibel)

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480z
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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und LightCycler® 480z
- 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 (BioScience-Grade, Nuklease-freies Wasser)

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- 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.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

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

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA-Präparation aus bronchoalveolärer Lavage

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

Der RIDA®GENE Legionella 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 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 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**, das **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

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

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

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

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

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

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

## 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 DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße 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 abzentrifugieren 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

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, 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

<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
Roche LightCycler® 480II	<i>Legionella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Legionella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Legionella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none</b>
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Legionella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Legionella</i> spp.	FAM	
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Legionella</i> spp.	Green	<b>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein</b>
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</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 Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2).

Die **Positive Control** für *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

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

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

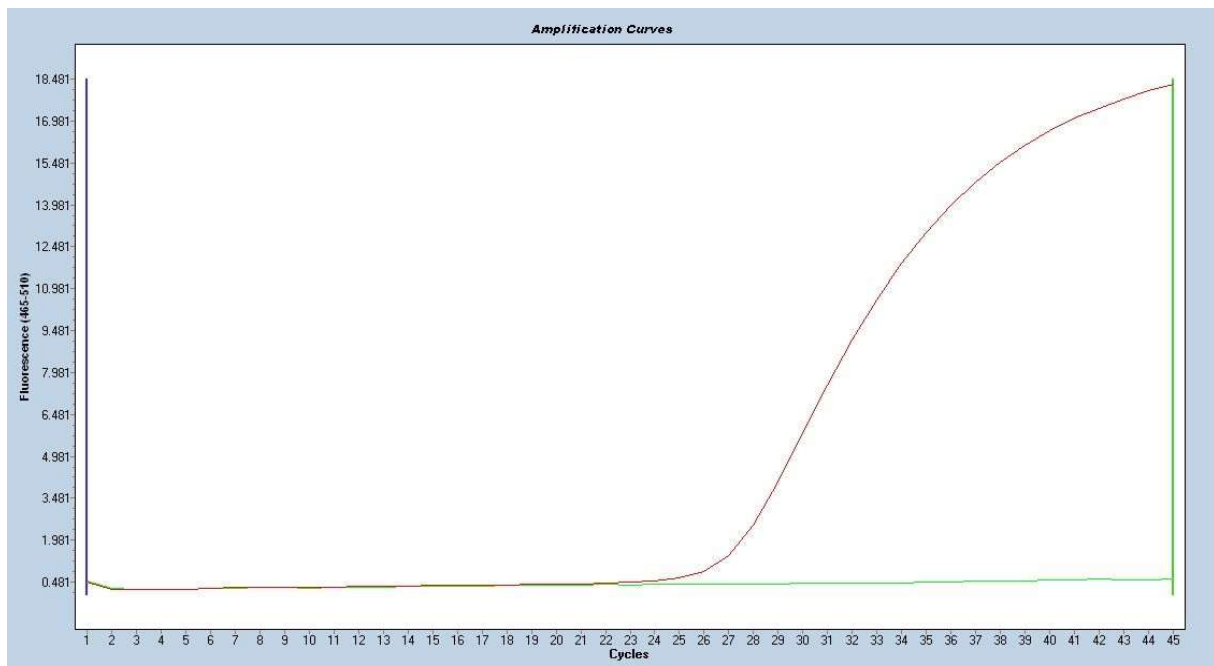
\*<sup>1</sup> Ein Ct-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

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

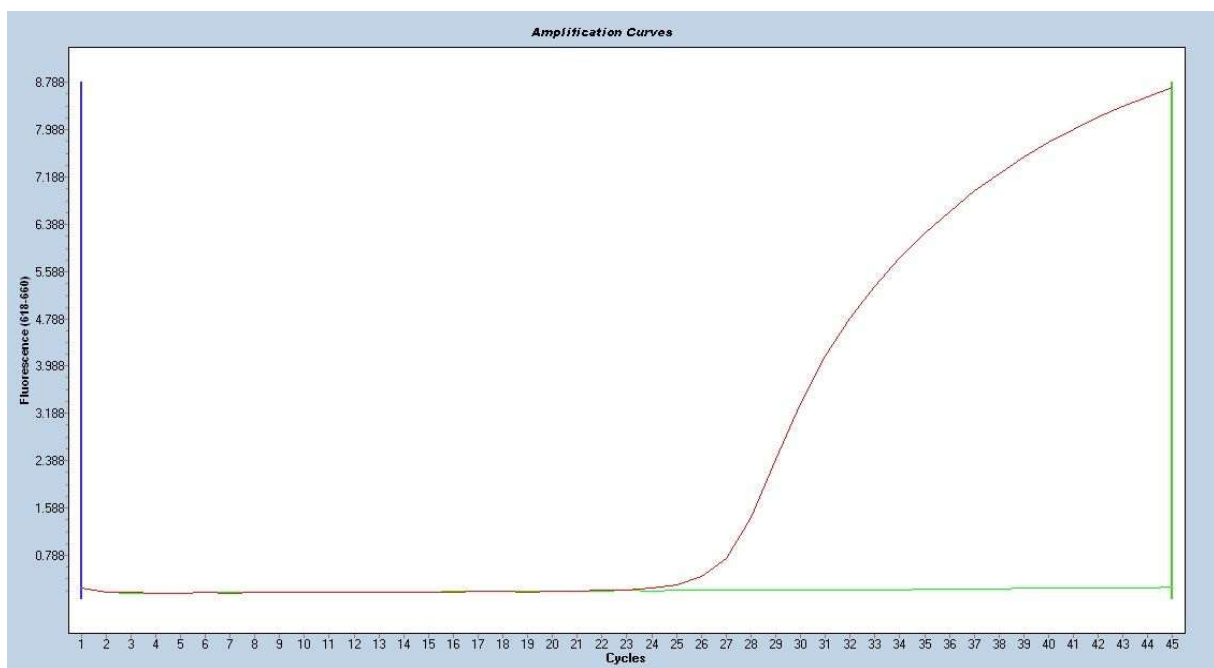
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

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 und Negativkontrolle (*Legionella* spp.) auf dem LightCycler® 480II



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

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

**Tab. 11:** Probenauswertung

Zielgene		ICD	Ergebnis
<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>		
positiv	negativ	positiv/negativ	<i>Legionella</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	positiv/negativ	Ungültig
positiv	positiv	positiv/negativ	<i>L. pneumophila</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	Zielgene sind nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	Ungültig

*Legionella* ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

*Legionella* ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle führen können.

*Legionella* ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. 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 im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. 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 humane bronchoalveolärer Lavage validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Legionella zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. 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.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (16S-rRNA) vorhanden sind.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 282 extrahierte respiratorische Proben mit dem RIDA®GENE Legionella Test und einer in-house real-time PCR in einem Institut in Deutschland untersucht (s. Tab 12, Tab.13). Die Extraktion erfolgte auf dem MagNa Pure 96. Die anschließende real-time PCR erfolgte auf dem LightCycler® 480II.

**Tab. 12:** Korrelation der *Legionella pneumophila*-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Legionella real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Legionella	Positiv	51	0	51	Pos. Übereinstimmung: 100 %
	Negativ	0	231	231	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	51	231	282	

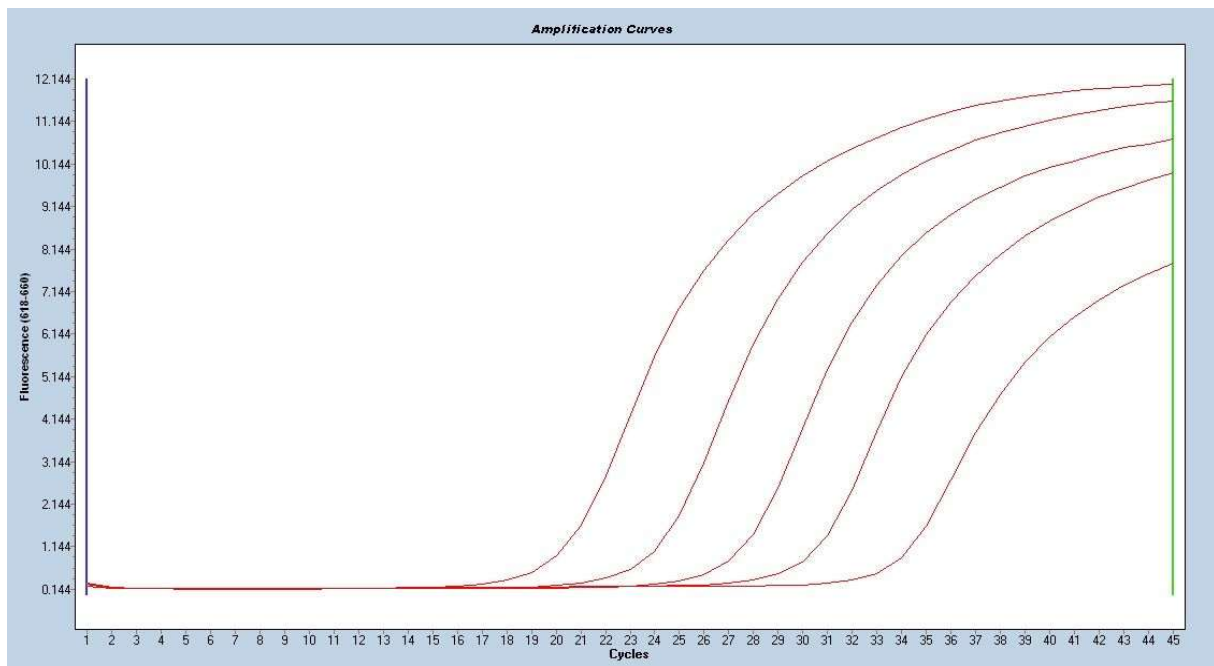
**Tab. 13:** Korrelation der *Legionella* spp.-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Legionella real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Legionella	Positiv	70	0	70	Pos. Übereinstimmung: 100 %
	Negativ	0	212	212	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	70	212	282	

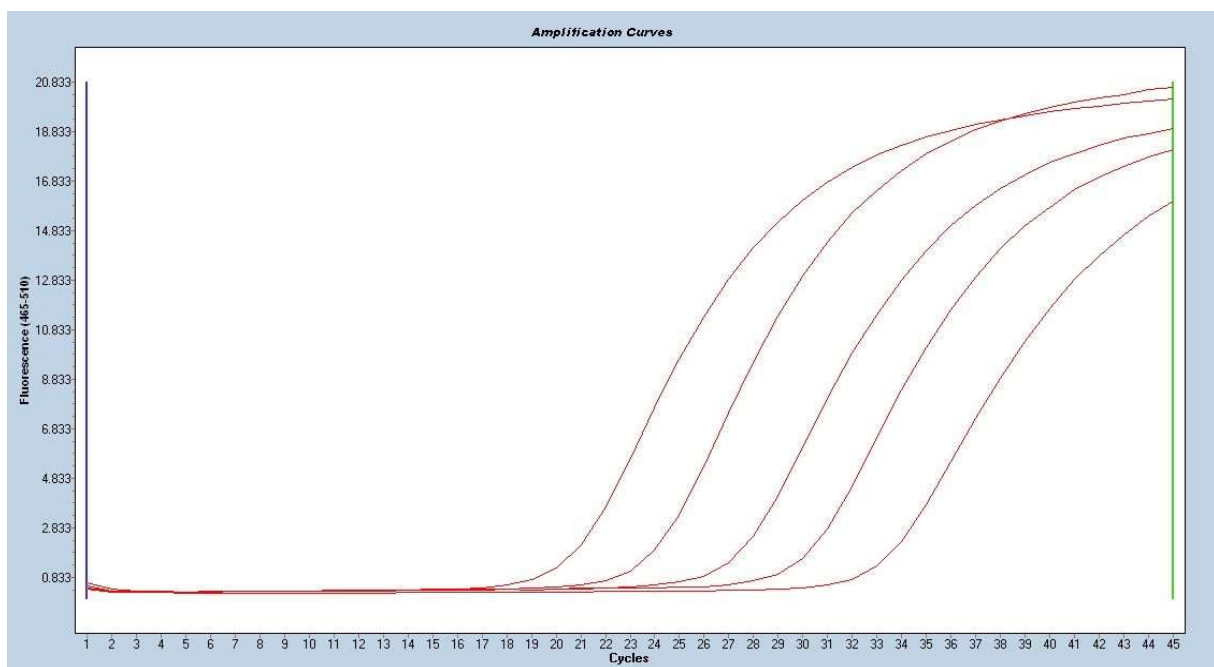
### 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien / Reaktion.

Die folgenden Abbildungen 3 und 4 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu\text{l}$ ) auf dem LightCycler® 480II.



**Abb. 3:** Verdünnungsreihe *Legionella* spp. ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu\text{l}$ ) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 4:** Verdünnungsreihe *L. pneumophila* ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu\text{l}$ ) auf dem LightCycler® 480II



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

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* aus humaner bronchoalveolärer Lavage. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s.Tab.14):

**Tab. 14:** Kreuzreaktivitätstestung

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

### 13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen Legionellen-Stämmen untersucht (s. Tab. 15). Alle Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR nachgewiesen.

**Tab. 15:** Analytische Reaktivitätstestung










<b>Stamm</b>	<b>Serogruppe</b>	<b>Legionella spp.</b>	<b>Legionella pneumophila</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	1	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	2	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	3	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	4	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	5	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	6	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	7	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	8	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	9	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	10	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	11	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	12	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	13	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	14	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella anisa</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella dumoffi</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella cardiaca</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella feeleeii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella gormanii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella hackeliae</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella jordanis</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella longbeachae</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella maceachernii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella micdadei</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella oakridgensis</i>	-	<b>positiv</b>	negativ

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-07-30	Vorversion
2020-10-02	Generelle Überarbeitung 13.1 Klinische Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -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. Howden BP *et al.* Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484–488.
2. Benin AL *et al.* An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237–243.
3. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
4. Joseph C *et al.* Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311–320.

## RIDA® GENE Legionella

REF PG8005

### 1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA® GENE Legionella is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. from human bronchoalveolar lavage fluid (BAL).

The RIDA® GENE Legionella multiplex real-time PCR is intended for use as an aid in diagnosis of respiratory infections caused by *Legionella*.

### 2. Summary and explanation of the test

The Genus *Legionella* belongs to the family of *Legionellaceae* and can be divided in over 40 species with more than 70 serogroups. *Legionella* are facultative, intracellular gram-negative bacteria and their infectious peak occurs during the summer months and early fall. The Genus *Legionella* belongs to the family of *Legionellaceae* and can be divided in over 40 species with more than 70 serogroups. *Legionella* are facultative, intracellular gram-negative bacteria and their infectious peak occurs during the summer months and early fall. One differentiates between community-acquired infections, travel-associated disease and hospital-acquired infections. In the US, the mortality rate of hospital-acquired *Legionella* infections is between 15 – 20%.<sup>1,2</sup> In Europe, 12% of all *Legionella* infections are fatal. Of the broad variety of *Legionella* species, two human pathogenic species are of importance. *L. pneumophila* primarily causes Legionnaire's disease and *L. longbeachae* results in Pontiac fever. Pontiac fever is an acute self-limiting influenza-like diseases, however, no pneumoniae occurs. About 7% of people infected with *Legionella* develop Pontiac fever.<sup>3</sup>

*L. pneumophila* has 16 serogroups, whereas about 70% of all *Legionella* infections in Europe are due to *L. pneumophila* serogroup 1. Other *Legionella* species that result in an infection are for instance *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* and *L. longbeachae*.<sup>4</sup>

Legionnaire's disease is an acute respiratory infection which is caused by *L. pneumophila* in 90% of cases. In 1976, this disease was first described during a meeting of the American Legion in Philadelphia, hence the name of the disease. In 2013, two other outbreaks of Legionnaire's disease with a total of 6 fatal cases were reported in Brisbane, Australia and Reynoldsburg, Ohio. Symptoms include fever, cough (dry or sputum producing) and shivering. Other, less common symptoms are

diarrhea, vomiting, bradycardia and hyponatremia.<sup>3</sup> People of every age can be infected, but old people as well as smokers and patients with chronic lung infection are more prone to such a disease. Even in countries with an effective health care system almost 90% of cases of Legionnaires's disease are not diagnosed since the clinical presentation can differ substantially and the disease is so rare. In addition, it is very difficult to differentiate Legionnaire's disease from other pneumonia solely on the basis of symptoms or by chest X-ray. Therefore, sensitive and specific detection methods such as real-time PCR offer an advantage for the detection of *Legionella* infections.

### 3. Test principle

RIDA<sup>®</sup>GENE Legionella is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* from bronchoalveolar lavage fluid (BAL). After DNA isolation, amplification of gene fragments (16S-rRNA, if present) specific for *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* occurs.

The amplified target is detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA<sup>®</sup>GENE Legionella test contains an **Internal Control DNA** (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR inhibition.

### 4. Reagents provided

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

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	<b>Reaction Mix</b>	2x	1050 µl	yellow
2	<b>Taq-Polymerase</b>	1x	80 µl	red
D	<b>Internal Control DNA</b>	2x	1700 µl	orange
N	<b>No Template Control</b>	1x	450 µl	white
P	<b>Positive Control</b>	1x	200 µl	blue

## 5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw and fully defrost reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 15 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

## 6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR test is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

**Tab. 2:** Necessary equipment (compatible)

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

**Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler® 480II and LightCycler® 480z
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- PCR water (BioScience grade, nuclease-free water)

## 7. Precautions for users

For *in vitro* diagnostic use.

- This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed.
- The instruction manual for the test procedure has to be followed.
- Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes.
- During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.
- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Collection and storage of samples

### 8.1 DNA isolation of bronchoalveolar lavage

For DNA isolation of bronchoalveolar lavage, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

The RIDA<sup>®</sup>GENE Legionella test contains an **Internal Control DNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control DNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab. 4).

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must not be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and positive control PCR Mix.



## 9. Test procedure

### 9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control DNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

**Tab. 4:** Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
D	Internal Control DNA	1.0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21.0 µl</b>	<b>231.0 µl</b>

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

## 9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

**Negative control:** Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

**Note:** If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the negative control.

**Sample:** Add 5 µl DNA extract to the pre-pipetted Master-Mix.

**Positive control:** Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

**Note:** If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (see Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab. 8).

## 9.3 PCR Instrument set-up

### 9.3.1 DNA real-time PCR profile

**Tab. 5:** DNA real-time PCR profile for LightCycler® series and Rotor-Gene Q

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

**Note:** Annealing and Extension occur in the same step.

**Tab. 6:** DNA real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, CFX96™

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

**Note:** Annealing and Extension occur in the same step.

### 9.3.2 Universal real-time PCR profile

**Note:** The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA®GENE DNA and RNA real-time PCR assays in one run.

**Tab. 7:** Universal real-time PCR profile for LightCycler® series

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

**Note:** Annealing and Extension occur in the same step.

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

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

**Note:** Annealing and Extension occur in the same step.

## 9.4 Detection Channel Set-up

**Tab. 9:** Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection Channel	Note
Roche LightCycler® 480II	<i>Legionella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required</b>
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Legionella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required</b>
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Legionella</i> spp.	FAM	<b>Check that passive reference option ROX is none</b>
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Legionella</i> spp.	FAM	<b>Check that passive reference option ROX is none</b>
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Legionella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Legionella</i> spp.	Green	<b>The gain settings have to be set to 5</b>
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Red	

## 10. Quality Control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer's instruction. Positive and negative controls have to show correct results (see Table 10, Fig. 1, Fig. 2) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** for *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* has a concentration of  $10^3$  copies/ $\mu$ l. In each PCR run it is used in a total amount of  $5 \times 10^3$  copies.

**Tab. 10:** For a valid run, the following conditions must be met

Sample	Assay result	IAC Ct	Target Ct
Positive Control	Positive	NA *1	See Quality Assurance Certificate
Negative Control	Negative	Ct > 20	0

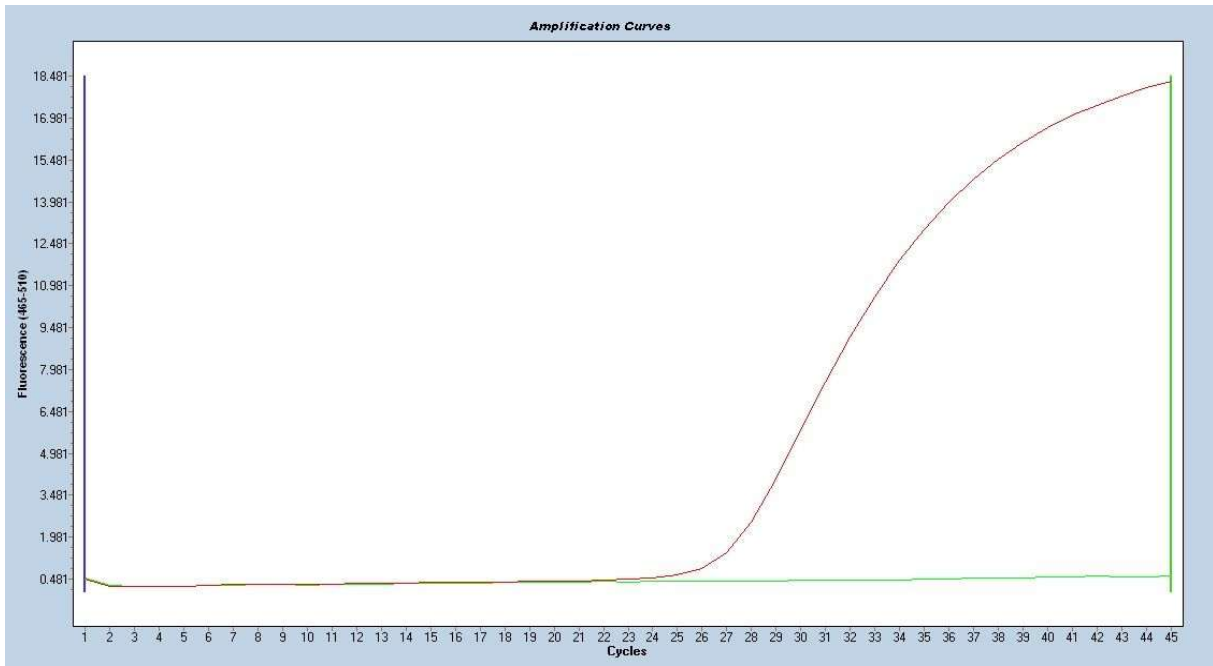
\*1 No Ct value is required for the IAC to make a positive call for the positive control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

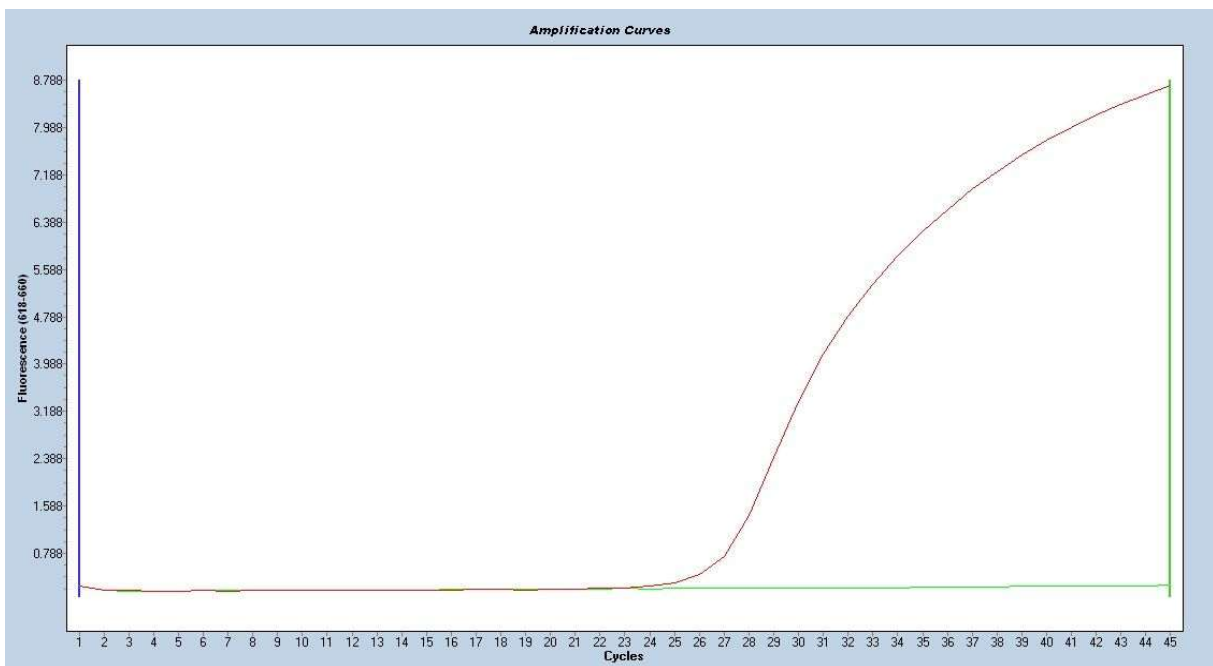
If the negative control is not negative but the positive control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure



**Fig. 1:** Correct run of the positive and negative control (*Legionella* spp.) on the LightCycler® 480II



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

## 11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 11.

**Tab.11:** Sample interpretation

Targent genes			
<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	ICD	Ergebnis
positive	negative	positive/negative	<i>Legionella</i> spp. detected
negative	positive	positive/negative	Invalid
positive	positive	positive/negative	<i>L. pneumophila</i> detected
negative	negative	positive	Target genes not detected
negative	negative	negative	Invalid

*Legionella* is detected, if the sample DNA and the Internal Control DNA show an amplification signal in the detection system.

*Legionella* is also detected, if the sample DNA shows an amplification signal but none for the Internal Control DNA in the detection system. The detection of the internal amplification control is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control DNA.

*Legionella* is not detected, if the sample DNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control DNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control DNA.

A sample is invalid, if the sample DNA and Internal Control DNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

## 12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for BAL samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA®GENE *Legionella* test.

6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target genes (16S-rRNA).

### 13. Performance characteristics

#### 13.1 Clinical performance

In a retrospective clinical validation study 282 extracted respiratory samples were analyzed with the RIDA®GENE Legionella test and an in-house real-time PCR assay in a laboratory in Germany (see Tab 12, Tab.13). Extraction was done using the MagNa Pure 96 and the real-time PCR was performed on the LightCycler® 480II.

**Tab. 12:** Correlation of the *Legionella pneumophila* results with the RIDA®GENE Legionella real-time PCR and reference in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR		Total	Comments
		Positive	Negative		
RIDA®GENE Legionella	Positive	51	0	51	Pos. agreement: 100 %
	Negative	0	231	231	Neg. agreement: 100 %
	Total	51	231	282	

**Tab. 13:** Correlation of the *Legionella* spp. results with the RIDA®GENE Legionella real-time PCR and reference in-house real-time PCR.

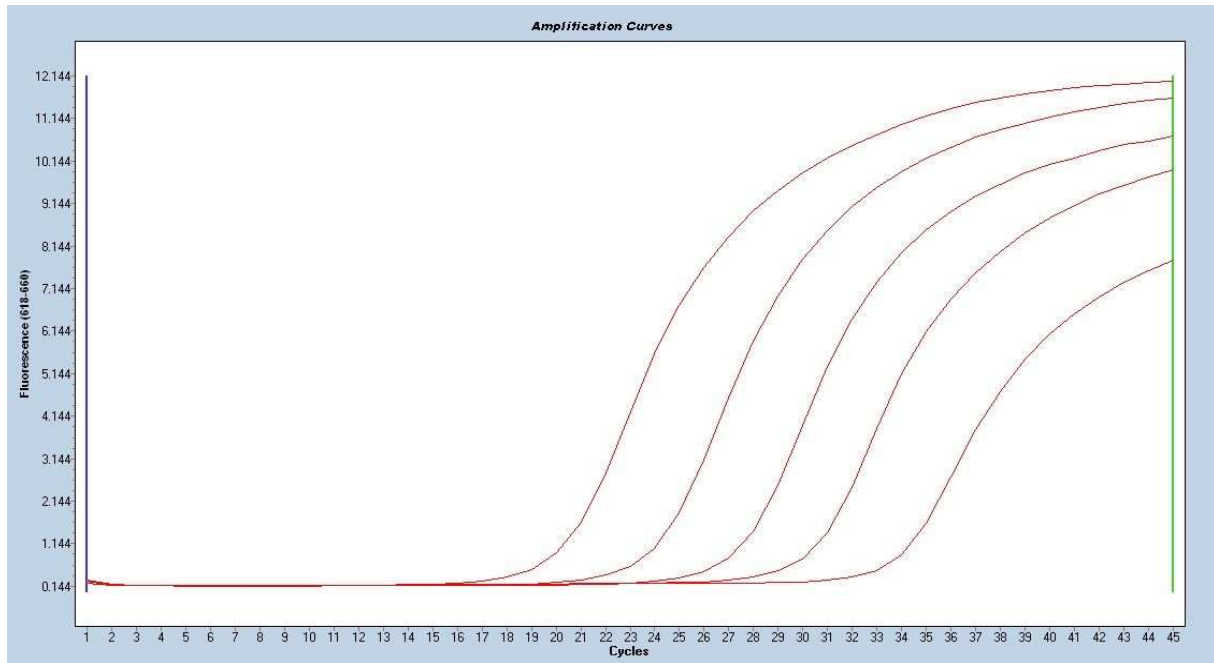
		In-house real-time PCR		Total	Comments
		Positive	Negative		
RIDA®GENE Legionella	Positive	70	0	70	Pos. agreement: 100 %
	Negative	0	212	212	Neg. agreement: 100 %
	Total	70	212	282	



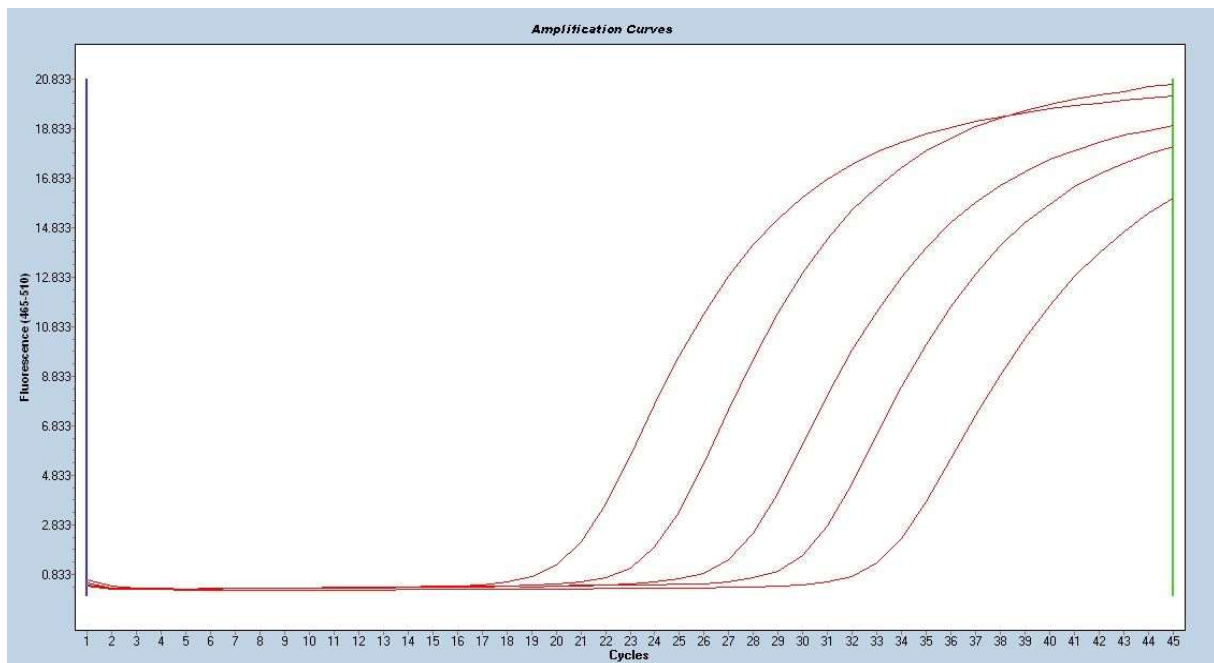
### 13.2 Analytical sensitivity

The RIDA<sup>®</sup>GENE Legionella multiplex real-time PCR has a limit of detection of  $\geq 10$  DNA copies per reaction.

The following figures 3 and 4 show dilution series of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* (each  $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Fig. 3:** Dilution series *Legionella* spp. ( $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 4:** Dilution series *Legionella pneumophila* ( $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA extraction and DNA concentration.

### 13.3 Analytical specificity

The RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR is specific for *Legionella* spp. and *L. pneumophila* from human bronchoalveolar lavage. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab.14):

**Tab. 14:** Cross-reactivity testing

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

### 13.4 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR was evaluated against multiple strains of *Legionella* spp. (see Tab. 15). All strains of the panel were detected by the RIDA®GENE Legionella real-time PCR.

**Tab. 15:** Cross-reactivity testing










Strain	Serogroup	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	1	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	2	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	3	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	4	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	5	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	6	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	7	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	8	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	9	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	10	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	11	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	12	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	13	positive	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	14	positive	positive
<i>Legionella anisa</i>	-	positive	negative
<i>Legionella bozemanii</i>	-	positive	negative
<i>Legionella dumoffi</i>	-	positive	negative
<i>Legionella cardiaca</i>	-	positive	negative
<i>Legionella feeleii</i>	-	positive	negative
<i>Legionella gormanii</i>	-	positive	negative
<i>Legionella hackeliae</i>	-	positive	negative
<i>Legionella jordanis</i>	-	positive	negative
<i>Legionella longbeachae</i>	-	positive	negative
<i>Legionella maceachernii</i>	-	positive	negative
<i>Legionella micdadei</i>	-	positive	negative
<i>Legionella oakridgensis</i>	-	positive	negative

## 14. Version history

Version number	Chapter and designation
2018-07-30	Previous version
2020-10-02	General revision 13.1 Clinical performance 14. Version history 15. Explanation of symbols

## 15. Explanation of symbols

### General symbols

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

### Testspecific symbols

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Literature

1. Howden BP *et al.* Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484–488.
2. Benin AL *et al.* An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237–243.
3. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
4. Joseph C *et al.* Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311–320.



# RIDA® GENE Legionella

**REF** PG8005

## 1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE Legionella es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Legionella pneumophila* y *Legionella* spp. en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humano.

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA® GENE Legionella está concebido como una ayuda para el diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por *Legionella*.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

El género *Legionella* pertenece a la familia *Legionellaceae* y puede dividirse en más de 40 especies con más de 70 serogrupos. *Legionella* es una bacteria gramnegativa, intracelular facultativa, cuya máxima tasa de infecciones ocurre durante los meses de verano y principios del otoño. El género *Legionella* pertenece a la familia de *Legionellaceae* y puede dividirse en más de 40 especies con más de 70 serogrupos. La *Legionella* es una bacteria gramnegativa, facultativa, intracelular y su pico infeccioso tiene lugar durante los meses de verano y a principios del otoño. Se puede diferenciar entre infecciones contraídas en la comunidad, en el hospital o asociadas con viajes. La tasa de mortalidad por infecciones nosocomiales por *Legionella* en Estados Unidos está entre el 15 % y el 20 %.<sup>1,2</sup> En Europa, las infecciones por *Legionella* son mortales en el 12 % de los casos. De la amplia variedad de especies de *Legionella*, hay dos especies patógenas humanas importantes. La *L. pneumophila* causa principalmente la enfermedad del legionario, mientras que la *L. longbeachae* causa la fiebre de Pontiac. La fiebre de Pontiac es una enfermedad aguda y autolimitante similar a la gripe; sin embargo, no cursa con neumonía. Cerca de un 7 % de las personas infectadas por *Legionella* desarrollan fiebre de Pontiac.<sup>3</sup>

Si bien existen 16 serogrupos de *L. pneumophila*, más del 70 % de las infecciones por *Legionella* en Europa están causadas por el serogrupo 1 de *L. pneumophila*. Otras especies de *Legionella* que pueden causar infecciones son, por ejemplo, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* y *L. longbeachae*.<sup>4</sup>

La enfermedad del legionario o legionelosis es una infección respiratoria aguda causada por *L. pneumophila* en el 90 % de los casos. Esta enfermedad se describió por primera vez en 1976, en un congreso de la Legión estadounidense en Filadelfia, de ahí su nombre. En 2013 se reportaron dos nuevos brotes de legionelosis, con un

total de 6 casos mortales en Brisbane, Australia y en Reynoldsburg, Ohio. Los síntomas incluyen fiebre, tos (seca o expectorante) y escalofríos. Otros síntomas menos frecuentes son diarrea, vómitos, bradicardia e hiponatremia.<sup>3</sup> La enfermedad del legionario puede afectar a personas de cualquier edad, pero son más sensibles a este tipo de infección los ancianos, los fumadores y los pacientes con infecciones pulmonares crónicas. Incluso en los países con un sistema sanitario eficaz, casi el 90 % de los casos de enfermedad del legionario permanece sin diagnosticar, ya que los síntomas clínicos pueden ser muy variables y la enfermedad es de incidencia bastante baja. Además, es muy difícil diferenciar la enfermedad del legionario de otras formas de neumonía solo basándose en los síntomas o la exploración radiológica. Por lo tanto, los métodos de detección sensibles y específicos, como la PCR en tiempo real son una ventaja para la detección de las infecciones por *Legionella*.

### 3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Legionella es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humano. Después de aislar el ADN, se amplifican los fragmentos génicos (ARNr 16S, si está presente) específicos de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila*.

La diana amplificada se detecta mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. La prueba RIDA®GENE Legionella contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de 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	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1,700 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 conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado y por completo los reactivos antes de utilizarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 °C-8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 15 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de forma adecuada (2 °C-8 °C).

## 6. Reactivos necesarios no suministrados

La prueba de PCR en tiempo real RIDA®GENE Legionella es adecuada para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

**Tabla 2:** Equipo necesario (compatible)

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

**Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II y el LightCycler® 480z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas)

## 7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas.
- Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba.

- No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.
- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

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

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

### 8.1 Aislamiento de ADN de lavado broncoalveolar

Para el aislamiento de ADN a partir de lavado broncoalveolar, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA®Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell® RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

La prueba RIDA®GENE Legionella contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, 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 del procedimiento de preparación de las muestras y como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de solución amortiguadora de lisado de muestras y no directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## 9. Ejecución de la prueba

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte la tabla 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C-8 °C) durante la etapa de trabajo.

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

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

**Tabla 4:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

## 9.2 Preparación de la mezcla de PCR

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

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

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

**Muestra:** Agregue 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

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

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5 y 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 serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

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 se llevan a cabo 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 se llevan a cabo en el mismo paso.

### 9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

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

**Tabla 7:** Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<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 se llevan a cabo 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 se llevan a cabo en el mismo paso.

## 9.4 Configuración del canal de detección

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

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	<i>Legionella</i> spp.	465/510	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Legionella</i> spp.	465/510	Se requiere el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna)
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna)
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Legionella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Legionella</i> spp.	Verde	La ganancia debe configurarse en 5
	ICD	Amarillo	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Rojo	



## 10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y negativos deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figuras 1 y 2) para determinar un ensayo válido.

El **Positive Control** para *Legionella* spp. y *L. pneumophila* tiene una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ l. En cada ensayo de PCR, se usa una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias.

**Tabla 10:** Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del IAC	Ct de la diana
Positive Control	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

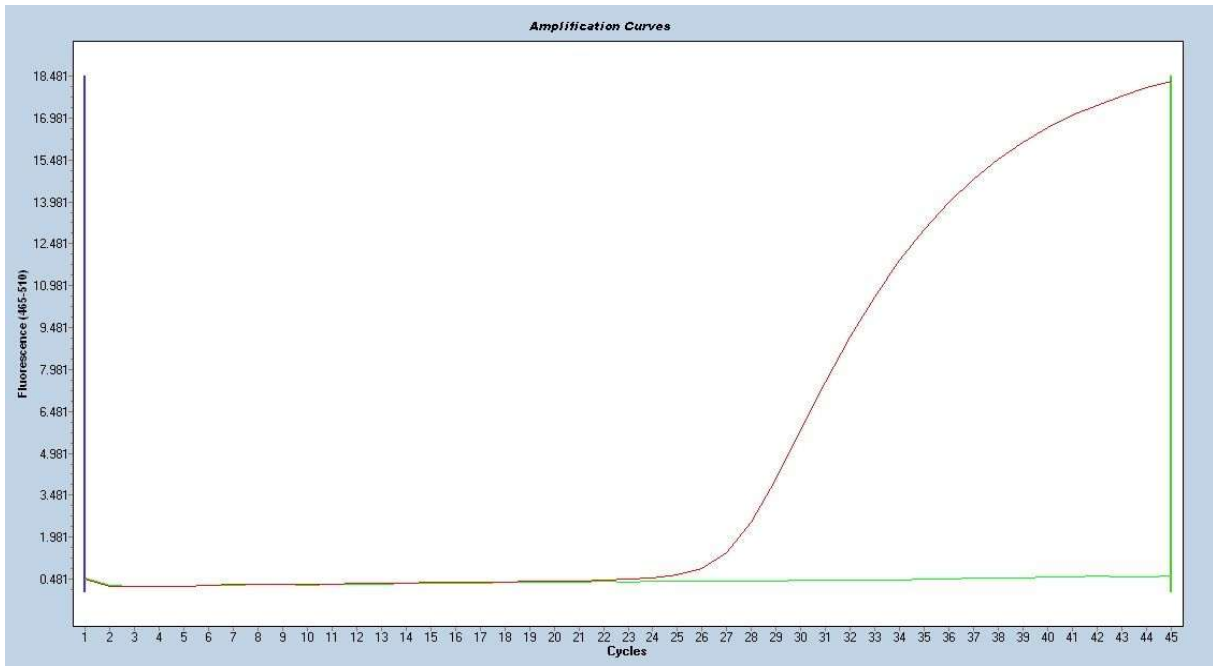
*\*1 No se requiere un valor de Ct del control interno de amplificación (IAC) para determinar que el control positivo sea positivo.*

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

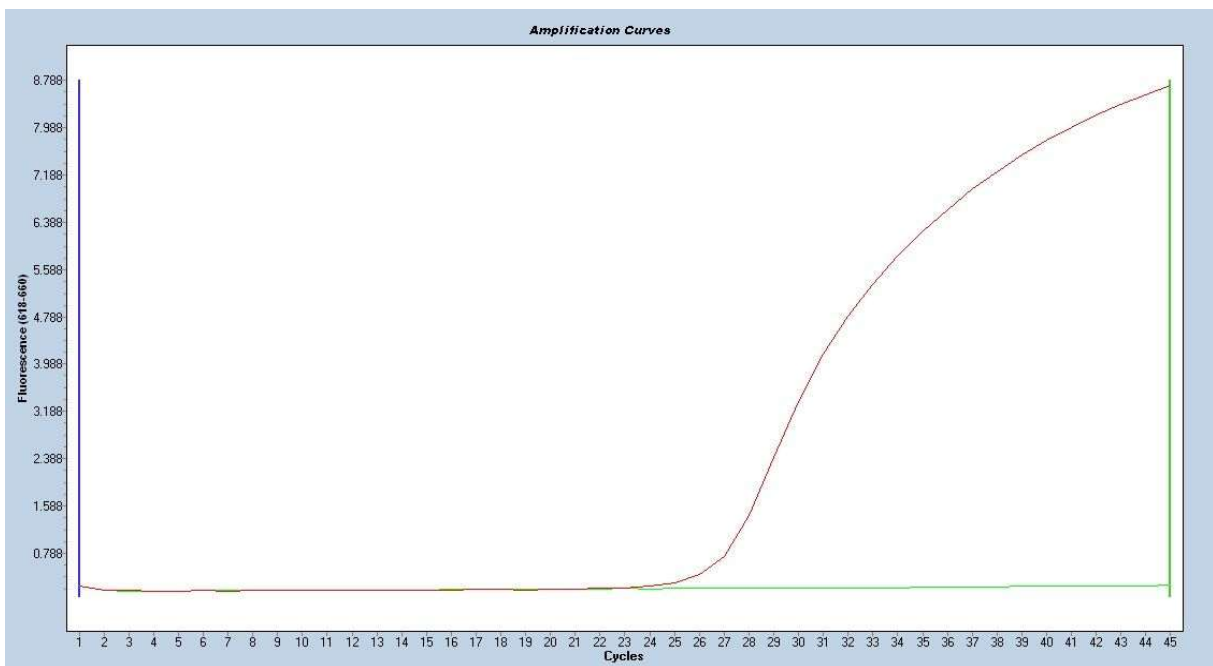
Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

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



**Figura 1:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Legionella* spp.) en el LightCycler® 480II



**Figura 2:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Legionella pneumophila*) 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

Genes diana			
<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	ICD	Resultado
positivo	negativo	positivo/negativo	<i>Legionella</i> spp. detectada
negativo	positivo	positivo/negativo	No válido
positivo	positivo	positivo/negativo	<i>L. pneumophila</i> detectada
negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	No válido

La *Legionella* se detecta si el ADN de la muestra y el Internal Control DNA muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

La *Legionella* también se detecta si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del Internal Control DNA en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del Internal Control DNA sea débil o esté ausente.

*Legionella* no se detecta si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero 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 ADN del Internal Control DNA.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del Internal Control DNA en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

## 12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de LBA.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar la detección de nuevas variantes y producir un resultado negativo falso con la prueba RIDA®GENE Legionella.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana (ARNr 16S).

## 13. Características de rendimiento

### 13.1 Rendimiento clínico

En un estudio de validación clínica retrospectivo se analizaron 282 muestras respiratorias extraídas con la prueba RIDA®GENE Legionella y con un ensayo de PCR en tiempo real interno, en un laboratorio en Alemania (consulte las tablas 12 y 13). La extracción se realizó con el sistema MagNa Pure 96 y la PCR en tiempo real se realizó en el LightCycler® 480II.

**Tabla 12:** Correlación de los resultados de *Legionella pneumophila* entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Legionella y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Legionella	Positivo	51	0	51	Concordancia pos.: 100 %
	Negativo	0	231	231	Concordancia neg.: 100 %
	Total	51	231	282	

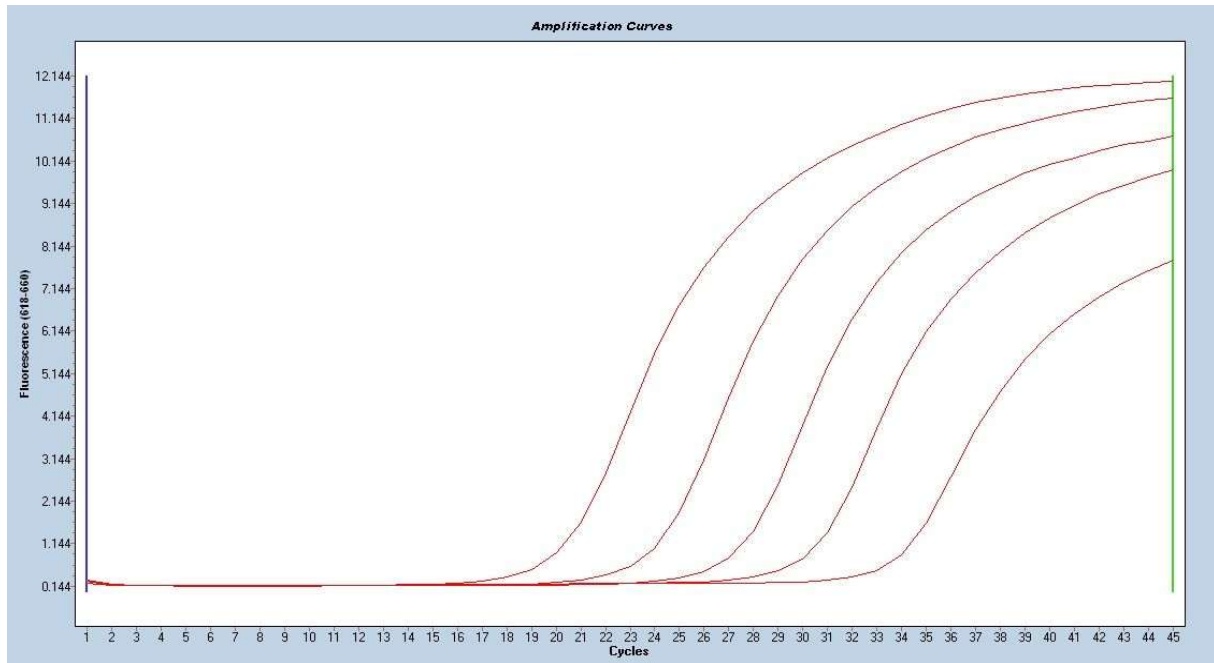
**Tabla 13:** Correlación de los resultados de *Legionella* spp. entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Legionella y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Legionella	Positivo	70	0	70	Concordancia pos.: 100 %
	Negativo	0	212	212	Concordancia neg.: 100 %
	Total	70	212	282	

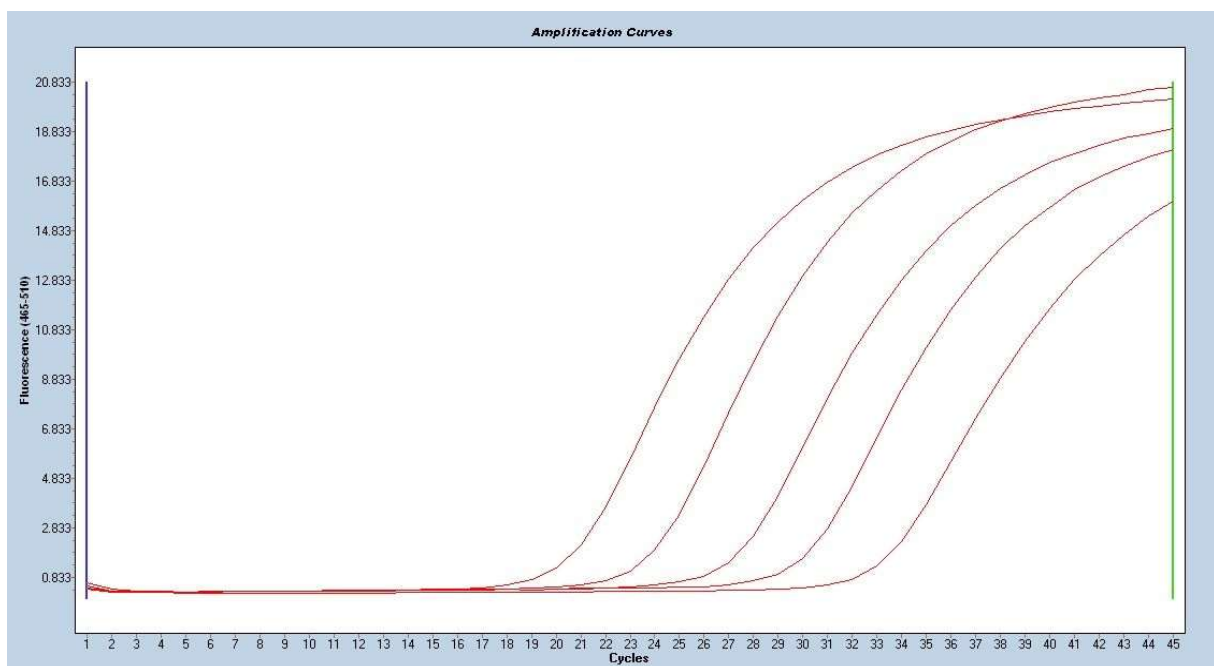
### 13.2 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Legionella tiene un límite de detección  $\geq 10$  copias de ADN por reacción.

Las siguientes figuras 3 y 4 muestran una dilución seriada de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$  en cada caso) en el LightCycler® 480II.



**Figura 3:** Dilución seriada de *Legionella* spp. ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II



**Figura 4:** Dilución seriada de *Legionella pneumophila* ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II

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

### 13.3 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Legionella es específico para *Legionella* spp. y *L. pneumophila* a partir de lavado broncoalveolar humano. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 14):

**Tabla 14:** Ensayos de reactividad cruzada

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

### 13.4 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Legionella se evaluó en comparación con varias cepas de *Legionella* spp. (consulte la tabla 15). El ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Legionella detectó todas las cepas del panel.

**Tabla 15:** Ensayos de reactividad cruzada

Cepa	Serogrupo	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	1	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	2	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	3	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	4	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	5	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	6	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	7	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	8	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	9	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	10	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	11	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	12	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	13	positivo	positivo
<i>Legionella pneumophila</i>	14	positivo	positivo
<b>Legionella spp. no pneumophila</b>			
<i>Legionella anisa</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella bozemanii</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella dumoffi</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella cardiaca</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella feeleeii</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella gormanii</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella hackeliae</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella jordanis</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella longbeachae</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella maceachernii</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella micdadei</i>	-	positivo	negativo
<i>Legionella oakridgensis</i>	-	positivo	negativo












## 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-07-30	Versión anterior
2020-10-02	Revisión general 13.1 Rendimiento clínico 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

## 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 ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Bibliografía

1. Howden BP *et al.* Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484-488.
2. Benin AL *et al.* An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237-243.
3. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis. 2012, World Health Organisation (WHO).
4. Joseph C *et al.* Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311-320.

# RIDA® GENE Legionella

**REF** PG8005

## 1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA® GENE Legionella est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Legionella pneumophila* et *Legionella* spp. à partir de liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humain.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Legionella est destiné à faciliter le diagnostic des infections respiratoires provoquées par *Legionella*.

## 2. Résumé et explication du test

Le gène *Legionella* appartient à la famille des *Legionellaceae* et peut être divisé en plus de 40 espèces avec plus de 70 sérogroupes. Les *Legionella* sont des bactéries intracellulaires gram-négatives facultatives et leur pic d'infection survient en été et au début de l'automne. Le genre *Legionella* appartient à la famille des *Legionellaceae* et regroupe plus de 40 espèces avec plus de 70 sérogroupes. Les *Legionella* sont des bactéries intracellulaires gram-négatives facultatives et leur pic d'infection est atteint en été et au début de l'automne. On peut distinguer les infections acquises dans la collectivité, la maladie associée au voyage et les infections nosocomiales. Aux États-Unis, le taux de mortalité dû aux infections nosocomiales par *Legionella* atteint 15 à 20 %<sup>1,2</sup>. En Europe, 12 % des cas d'infections par *Legionella* sont mortels. Parmi la grande variété d'espèces de *Legionella*, deux représentent d'importants pathogènes. *L. pneumophila* cause principalement la maladie du légionnaire et *L. longbeachae* provoque une fièvre de Pontiac. La fièvre de Pontiac est une maladie aiguë auto-limitative ressemblant à la grippe, mais sans que survienne une pneumonie. Environ 7 % des personnes infectées par *Legionella* développent une fièvre de Pontiac<sup>3</sup>. *L. pneumophila* se décompose en 16 sérogroupes ; alors qu'en Europe, environ 70 % des infections à *Legionella* sont dues au séro groupe 1 de *L. pneumophila*. D'autres espèces de *Legionella* entraînant une infection sont par exemple *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* et *L. longbeachae*<sup>4</sup>.

La maladie du légionnaire est une infection respiratoire aiguë due dans 90 % des cas à *L. pneumophila*. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1976, lors d'une réunion de la Légion américaine à Philadelphia, d'où le nom de la maladie. Deux autres épidémies de la maladie du légionnaire ont fait 6 morts en 2013 à Brisbane en Australie et à Reynoldsburg dans l'Ohio aux États-Unis. Fièvre, toux

(sèche ou avec production de crachat) et frissons en sont les symptômes. La diarrhée, les vomissements, la bradycardie et l'hyponatrémie sont d'autres symptômes, moins fréquents<sup>3</sup>. Des individus de tout âge peuvent être infectés, mais les personnes âgées, ainsi que les fumeurs et les patients souffrant d'infections pulmonaires chroniques sont plus sensibles à ce type de maladie. Même dans les pays dotés d'un système de soins de santé efficace, presque 90 % des cas de maladie du légionnaire ne sont pas diagnostiqués, car les symptômes cliniques peuvent varier sensiblement et la maladie est assez rare. De plus, il est très difficile de distinguer la maladie du légionnaire d'autres pneumonies sur la seule base des symptômes ou d'une radiographie du thorax. Par conséquent, des méthodes de détection sensibles et spécifiques telles que le test de PCR en temps réel offre un avantage pour la détection des infections à *Legionella*.

### 3. Principe du test

Le test RIDA®GENE Legionella est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* à partir de liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Après isolation de l'ADN, survient l'amplification des fragments de gène (16S-rRNA, si présent) spécifiques à *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila*.

La cible amplifiée est détectée grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-Polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE Legionella contient un Internal Control DNA (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

#### 4. Contenu du paquet

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

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

#### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 15 cycles de congélation/décongélation sans que les performances du test ne soient affectées (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

## 6. Réactifs requis, mais non fournis

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

**Tableau 2:** Matériel nécessaire (compatible)

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

**Remarque: utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

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

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

## 7. Mesures de précaution

Pour usage diagnostique *in vitro*.

- Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test.
- Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.
- Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

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

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Isolation de l'ADN à partir d'un lavage broncho-alvéolaire

Pour isoler l'ADN à partir d'un lavage broncho-alvéolaire, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA®Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Legionella inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

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

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

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

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

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement les réactifs **Reaction Mix**, **Taq-Polymerase**, **Positive Control**, **No Template Control** et **Internal Control DNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 °C et 8 °C).

**Tableau 3:** Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

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

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

**Tableau 4:** Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

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

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.



## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

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

**Contrôle négatif:** Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque:** si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

**Échantillon:** Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif:** Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque:** si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6, 7 et 8).

## 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

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

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

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

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

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

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

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

### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

**Remarque: le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel RIDA®GENE DNA et ARN sont effectués lors d'une même exécution.**

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

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

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

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

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

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

## 9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 480II	<i>Legionella</i> spp.	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Legionella</i> spp.	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Legionella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Legionella</i> spp.	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5
	ICD	Jaune	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Rouge	

## 10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Les contrôles positifs et négatifs doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figures 1 et 2) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le contrôle positif **Positive Control** pour *Legionella* spp. et *L. pneumophila* a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  copies.

**Tableau 10:** Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct IAC	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

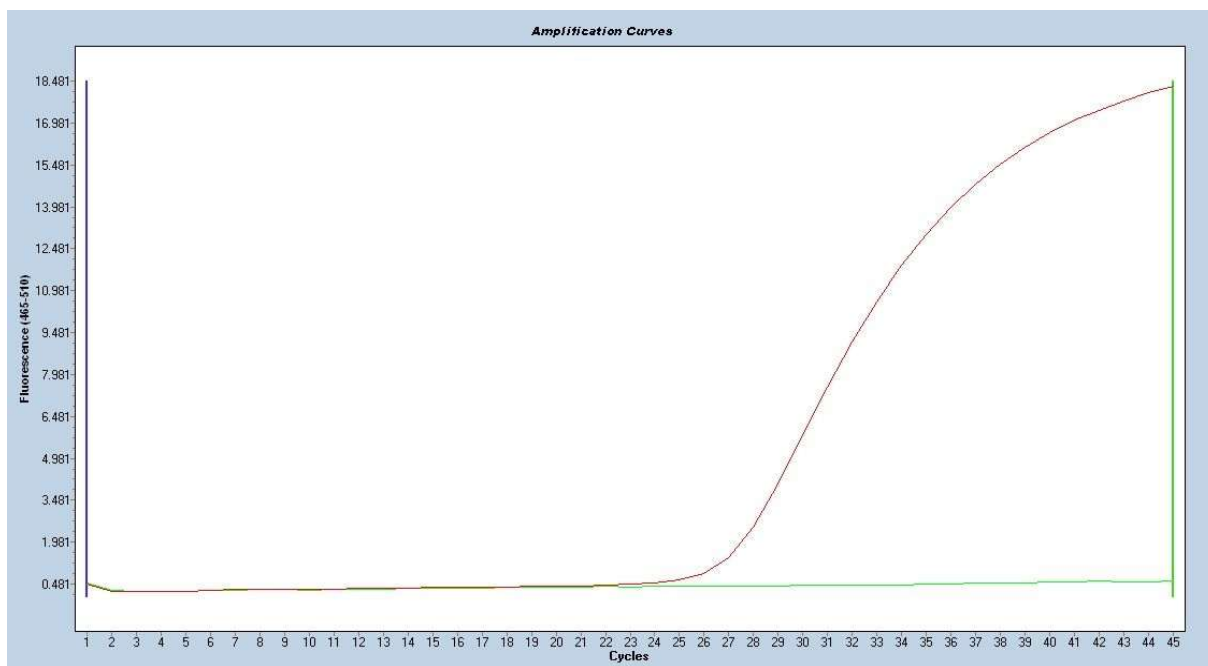
\*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'IAC soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

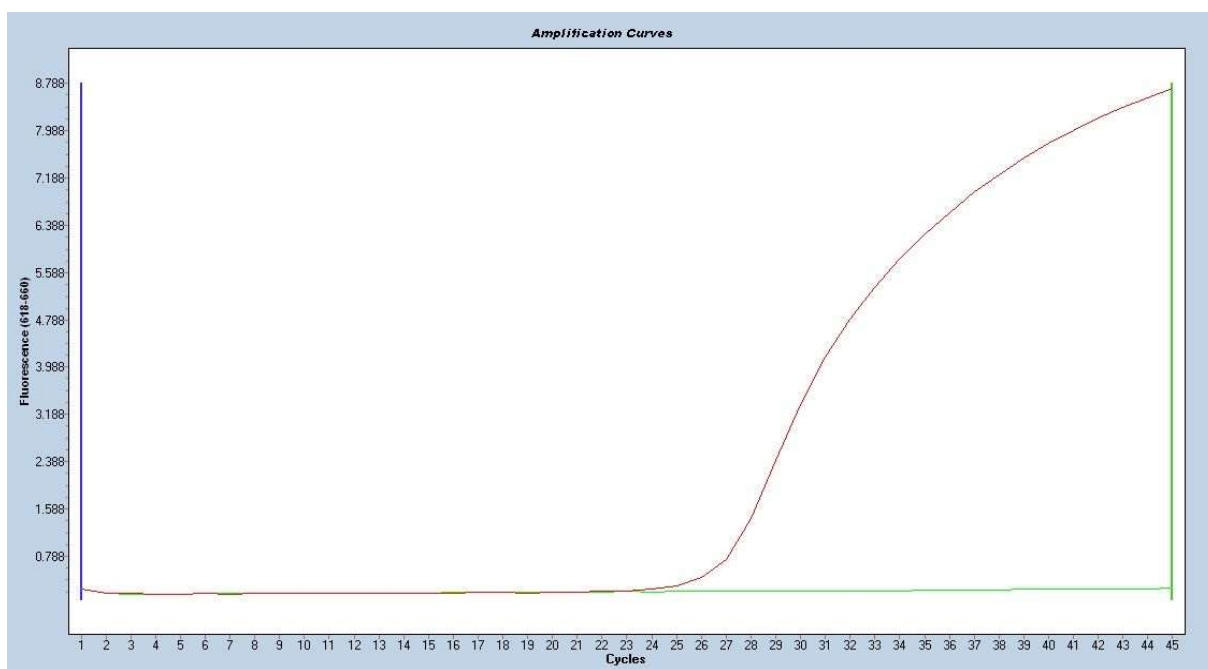
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



**Figure 1:** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Legionella* spp.) sur le LightCycler® 480II



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

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11:** Interprétation des échantillons

Gènes cibles			
<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	ICD	Ergebnis
positif	négatif	positif/négatif	<i>Legionella</i> spp. détecté
négatif	positif	positif/négatif	Non valide
positif	positif	positif/négatif	<i>L. pneumophila</i> détecté
négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	négatif	Non valide

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

*Legionella* est également détecté si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le Internal Control DNA. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent de l'ADN de contrôle interne Internal Control DNA.

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

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN de contrôle interne Internal Control DNA ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit encore être dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

## 12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être examiné dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de LBA.
3. Les prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects de l'échantillon ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA®GENE Legionella.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (ARNr 16S).



## 13. Performances

### 13.1 Performance clinique

Dans une étude de validation clinique rétrospective, 282 échantillons respiratoires extraits ont été analysés à l'aide du test RIDA®GENE Legionella et d'un test de PCR en temps réel interne dans un laboratoire situé en Allemagne (voir tableaux 12 et 13). L'extraction a été effectuée à l'aide de l'appareil MagNA Pure 96 et la PCR en temps réel a été réalisée sur le LightCycler® 480II.

**Tableau 12:** Corrélation des résultats d'analyse de *Legionella pneumophila* obtenus avec le test de PCR en temps réel RIDA®GENE Legionella et de la PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne		Total	Commentaires
		Positif	Négatif		
RIDA®GENE Legionella	Positif	51	0	51	Corrélation positive : 100 %
	Négatif	0	231	231	Corrélation négative : 100 %
	Total	51	231	282	

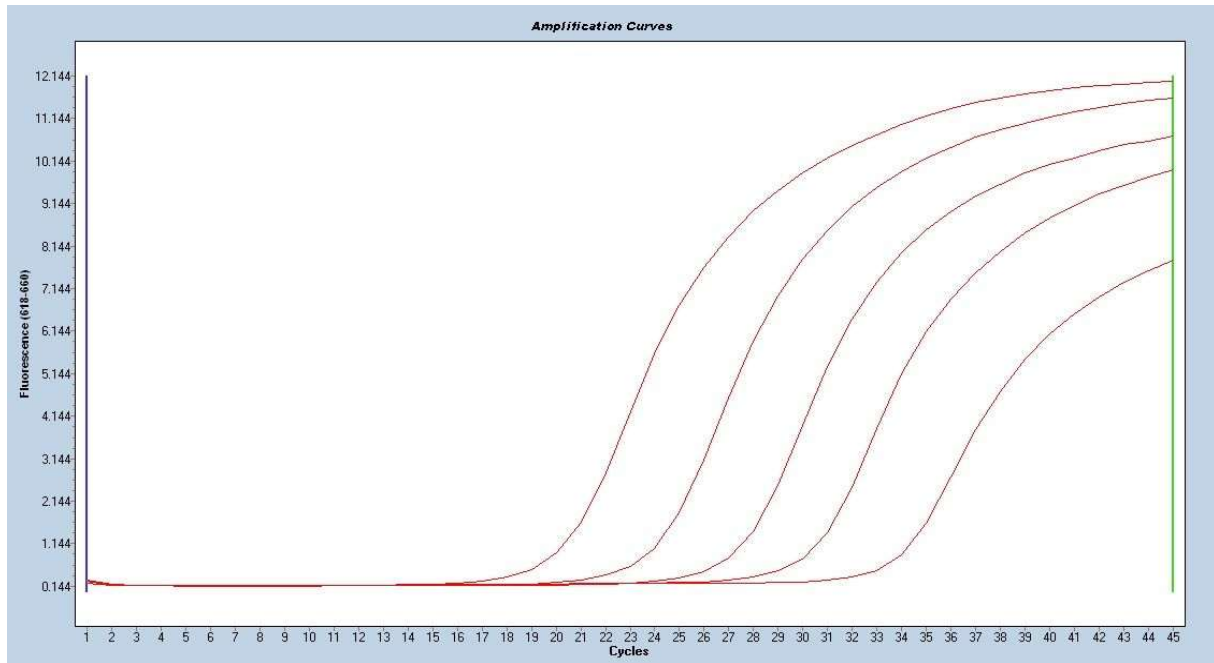
**Tableau 13:** Corrélation des résultats d'analyse de *Legionella* spp. obtenus avec le test de PCR en temps réel RIDA®GENE Legionella et de la PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne		Total	Commentaires
		Positif	Négatif		
RIDA®GENE Legionella	Positif	70	0	70	Corrélation positive : 100 %
	Négatif	0	212	212	Corrélation négative : 100 %
	Total	70	212	282	

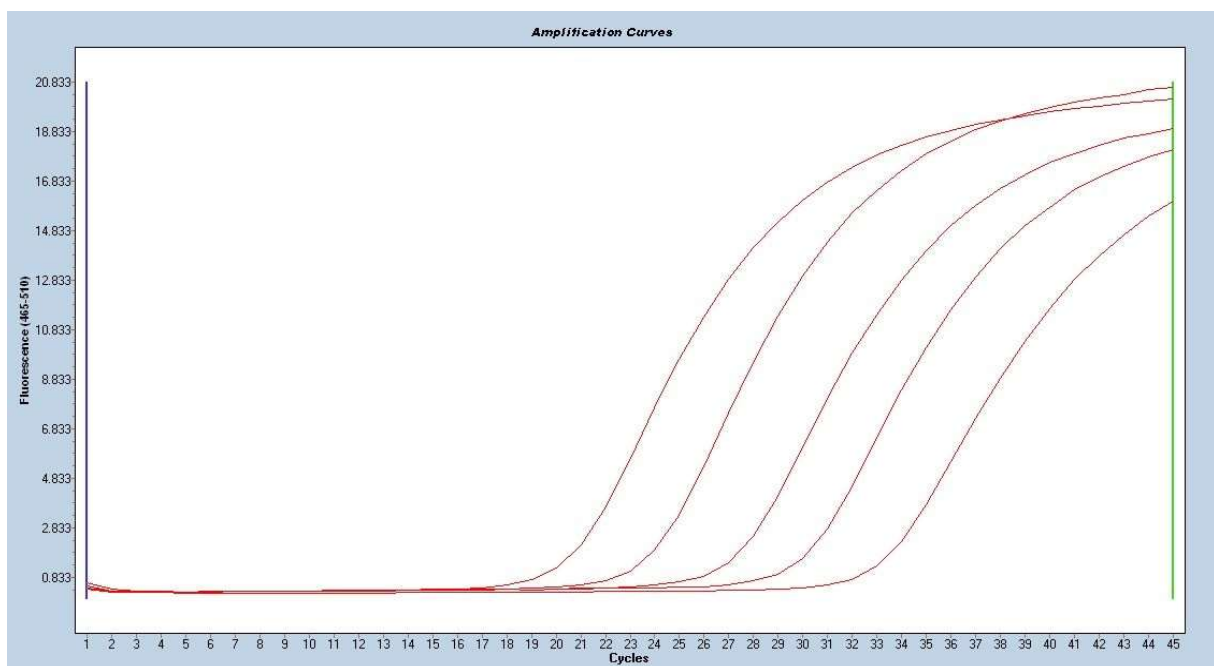
### 13.2 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Legionella est  $\geq 10$  copies d'ADN par réaction.

Les figures 3 et 4 suivantes montrent la série de dilutions de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* ( $10^5$  -  $10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$  chacune) dans le LightCycler® 480II.



**Figure 3:** Série de dilutions pour *Legionella* spp. ( $10^5$  –  $10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II



**Figure 4:** Série de dilutions pour *Legionella pneumophila* ( $10^5$  –  $10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

### 13.3 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Legionella est spécifique pour *Legionella* spp. et *L. pneumophila* issus d'un lavage broncho-alvéolaire humain. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 14):

**Tableau 14:** Test de la réactivité croisée

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

### 13.4 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Legionella a été évaluée par rapport à plusieurs souches de *Legionella* spp. (voir tableau 15). Toutes les souches du panel ont été détectées par le test de PCR en temps réel RIDA®GENE Legionella.

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










Souche	Sérogroupe	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	1	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	2	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	3	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	4	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	5	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	6	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	7	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	8	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	9	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	10	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	11	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	12	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	13	positif	positif
<i>Legionella pneumophila</i>	14	positif	positif
<b>Legionella spp. non pneumophila</b>			
<i>Legionella anisa</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella bozemanii</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella dumoffi</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella cardiaca</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella feeleeii</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella gormanii</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella hackeliae</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella jordanis</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella longbeachae</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella maceachernii</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella micdadei</i>	-	positif	négatif
<i>Legionella oakridgensis</i>	-	positif	négatif

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2018-07-30	Version précédente
2020-10-02	Révision générale 13.1 Performance clinique 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

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

### Symboles spécifiques au test

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Bibliographie

5. Howden BP *et al.* Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484-488.
6. Benin AL *et al.* An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237-243.
7. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis. 2012, World Health Organisation (WHO).
8. Joseph C *et al.* Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311-320.

# RIDA® GENE Legionella

**REF** PG8005

## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA® GENE Legionella è un test PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Legionella pneumophila* e *Legionella* spp. nel fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL) umano.

Il test PCR real-time multiplex RIDA® GENE Legionella è adatto come ausilio nella diagnosi delle infezioni respiratorie causate da *Legionella*.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Il genere *Legionella* appartiene alla famiglia delle *Legionellaceae* e si suddivide in più di 40 specie e oltre 70 sierogruppi. La *legionella* è un batterio gram-negativo facoltativo intracellulare; il suo picco infettivo si verifica durante i mesi estivi e l'inizio dell'autunno. Il genere *Legionella* appartiene alla famiglia delle *Legionellaceae* e può essere diviso in oltre 40 specie con più di 70 sierogruppi. I batteri *Legionella* sono batteri facoltativi, intracellulari gram-negativi, il cui picco infettivo si verifica in estate e all'inizio dell'autunno. Si distingue fra infezioni acquisite in comunità, malattie connesse ai viaggi e infezioni acquisite in ospedale. Negli Stati Uniti, il tasso di mortalità delle infezioni da *Legionella* acquisite in ospedale è del 15-20%.<sup>1,2</sup> In Europa, il 12% dei casi di infezioni da *Legionella* è mortale. Della grande varietà di specie di *Legionella*, due specie patogene umane sono considerate importanti. La *L. pneumophila*, che causa principalmente la malattia del legionario e la *L. longbeachae*, che provoca la febbre di Pontiac. La febbre di Pontiac è una malattia simil-influenzale autolimitante acuta che, tuttavia, non determina polmonite. Circa il 7% dei soggetti che contraggono un'infezione da *Legionella* sviluppa la febbre di Pontiac.<sup>3</sup>

La *L. pneumophila* ha 16 sierogruppi, mentre circa il 70% di tutte le infezioni da *Legionella* in Europa sono causate da *L. pneumophila*, appartenente al sierogruppo 1. Altre specie di *Legionella* che si traducono in infezioni sono, ad esempio, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* e *L. longbeachae*.<sup>4</sup>

La malattia del legionario è un'infezione respiratoria acuta causata nel 90% dei casi da *L. pneumophila*. La malattia è stata descritta per la prima volta nel 1976, durante una riunione di veterani a Filadelfia; da qui il nome della malattia. Altre due epidemie della malattia del legionario, per un totale di 6 decessi, si sono verificate nel 2013 a Brisbane, in Australia, e a Reynoldsburg, in Ohio. I sintomi includono febbre, tosse

(secca o produttiva di espettorato) e brividi. Altri sintomi meno frequenti sono diarrea, vomito, bradicardia e iponatriemia.<sup>3</sup> Possono essere infettati dalla malattia del legionario soggetti di ogni età, ma gli anziani, i fumatori e i pazienti affetti da disturbi polmonari cronici sono più esposti a tale infezione. Anche nei paesi con un sistema sanitario efficace, quasi il 90% dei casi di legionellosi non viene diagnosticato poiché il quadro clinico può differire in modo sostanziale e la malattia è assai rara. Inoltre, è molto difficile differenziare la legionellosi dalle altre forme di polmonite solo sulla base dei sintomi o dalla radiografia del torace. Pertanto, metodi sensibili e specifici come la PCR real-time offrono un vantaggio in termini di rivelazione delle infezioni da *Legionella*.

### 3. Principio del test

RIDA®GENE Legionella è un test PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* nel fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL) umano. Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione dei frammenti genetici (16S-rRNA, se presenti) specifici per la *Legionella* spp. e la *Legionella pneumophila*.

Il target amplificato viene rivelato con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Legionella contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione del campione e/o per determinare la possibile inibizione della PCR.

### 4. Contenuto della confezione

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

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



## 5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2-8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 15 cicli di congelamento/scongelamento senza compromettere i test (ad esempio, dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2-8 °C).

## 6. Reagenti necessari ma non in dotazione

Il test PCR real-time multiplex RIDA®GENE Legionella è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria (compatibile)

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

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

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

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

## 7. Avvertenze e misure precauzionali

Per la diagnostica *in vitro*.

- Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test.
- Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose.
- Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test.
- Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si manipolano i campioni o i reagenti.
- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

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

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

### 8.1 Isolamento del DNA dal lavaggio broncoalveolare

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

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

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

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

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

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

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

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

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

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

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

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

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

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

## 9.2 Preparazione della PCR Mix

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

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

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

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

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

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

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere 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 della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

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

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

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

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

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

### 9.3.2 Profilo PCR real-time universale

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

**Tabella 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

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

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

**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

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

## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

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

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	<i>Legionella</i> spp.	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Legionella</i> spp.	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Legionella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Legionella</i> spp.	Verde	Le impostazioni di amplificazione (gain) devono essere regolate su 5
	ICD	Giallo	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Rosso	

## 10. Controllo di qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Figura 1, Figura 2).

Il **Positive Control** per *Legionella* spp. e *L. pneumophila* ha una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie.

**Tabella 10:** Perché l'esecuzione sia valida, occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct IAC	Ct Target
Positive Control	Positivo	NA *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Negative Control	Negativo	Ct > 20	0

\*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'IAC.

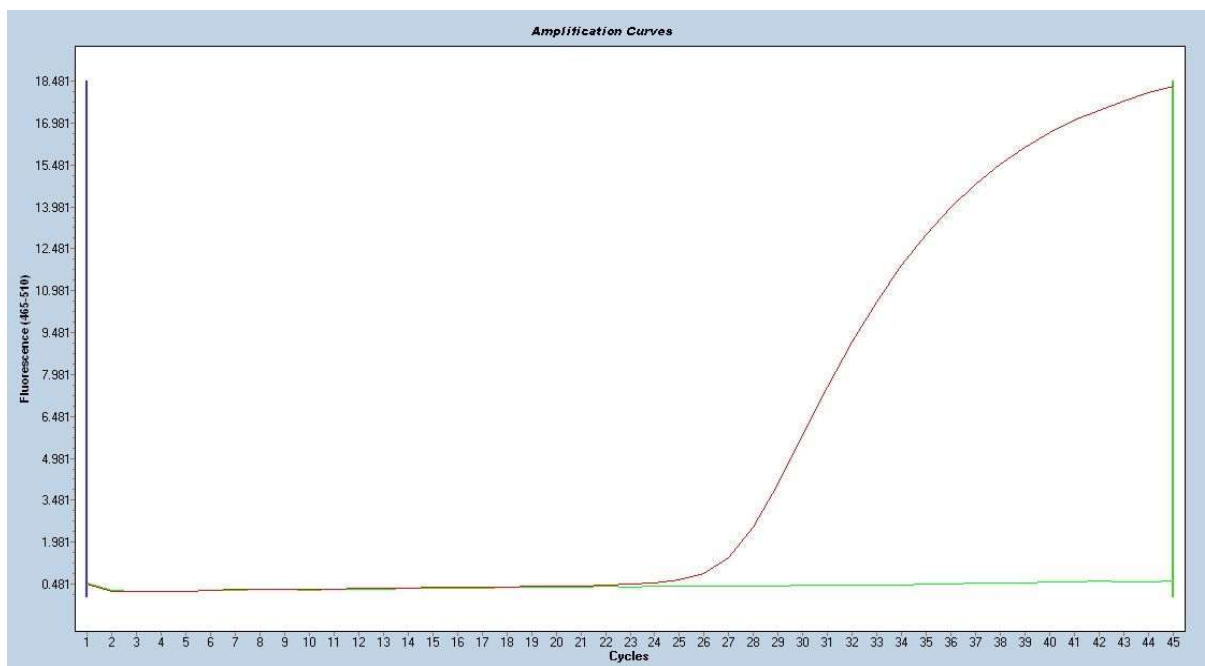
Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

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

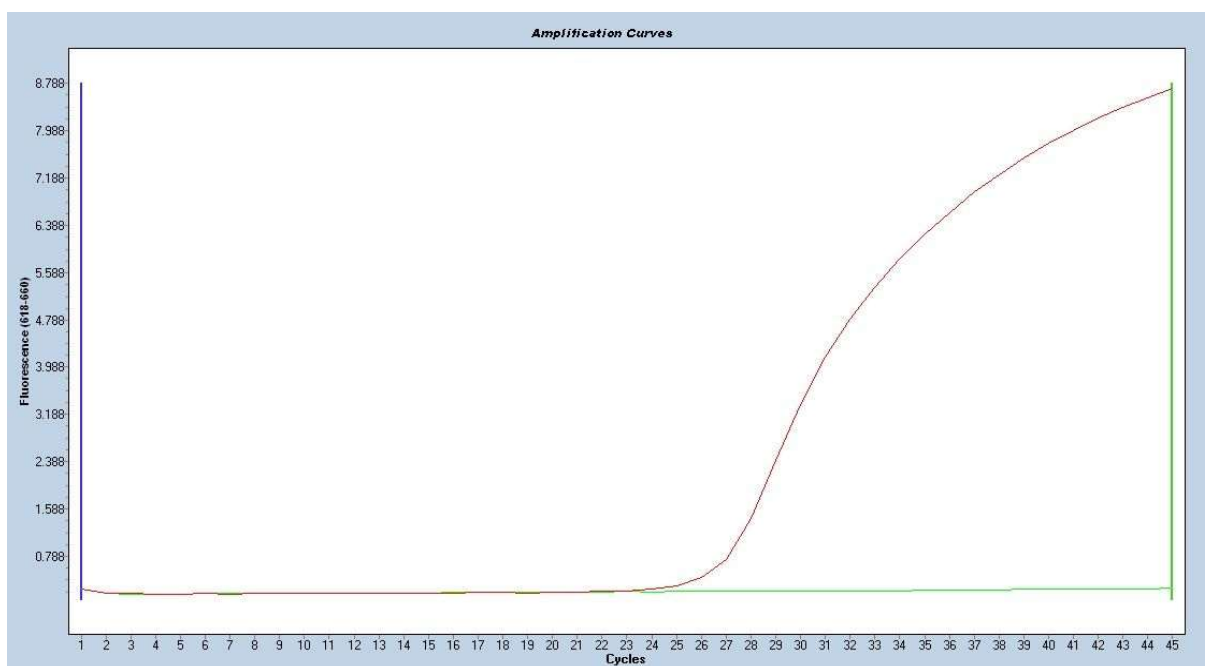
Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

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





**Figura 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Legionella* spp.) sul LightCycler® 480II



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

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tabella 11:** Interpretazione del campione

Geni target			
<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	ICD	Risultato
<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Legionella</i> spp. rilevata</b>
Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Non valido</b>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>L. pneumophila</i> rilevata</b>
Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Geni target non rivelati</b>
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Non valido</b>

La *Legionella* è comprovabile se sia il DNA del campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

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

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

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

## 12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di BAL.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti e causare un falso negativo con il test RIDA®GENE Legionella.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rilevazione (LoD) possono essere rilevati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni target (16S-rRNA).

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Prestazioni cliniche

In uno studio retrospettivo di validazione clinica condotto presso un laboratorio in Germania abbiamo analizzato 282 campioni respiratori umani con il test RIDA®GENE Legionella e con un test PCR real-time interno (vedere Tabella 12 e Tabella 13). L'estrazione è stata eseguita utilizzando MagNa Pure 96 e la PCR real-time è stata eseguita su LightCycler® 480II.

**Tabella 12:** Confronto tra i risultati relativi a *Legionella pneumophila* con il test PCR real-time RIDA®GENE Legionella e il test PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno		Totale	Commenti
		Positivo	Negativo		
RIDA®GENE Legionella	Positivo	51	0	51	Concordanza pos.: 100%
	Negativo	0	231	231	Concordanza neg.: 100%
	Totale	51	231	282	

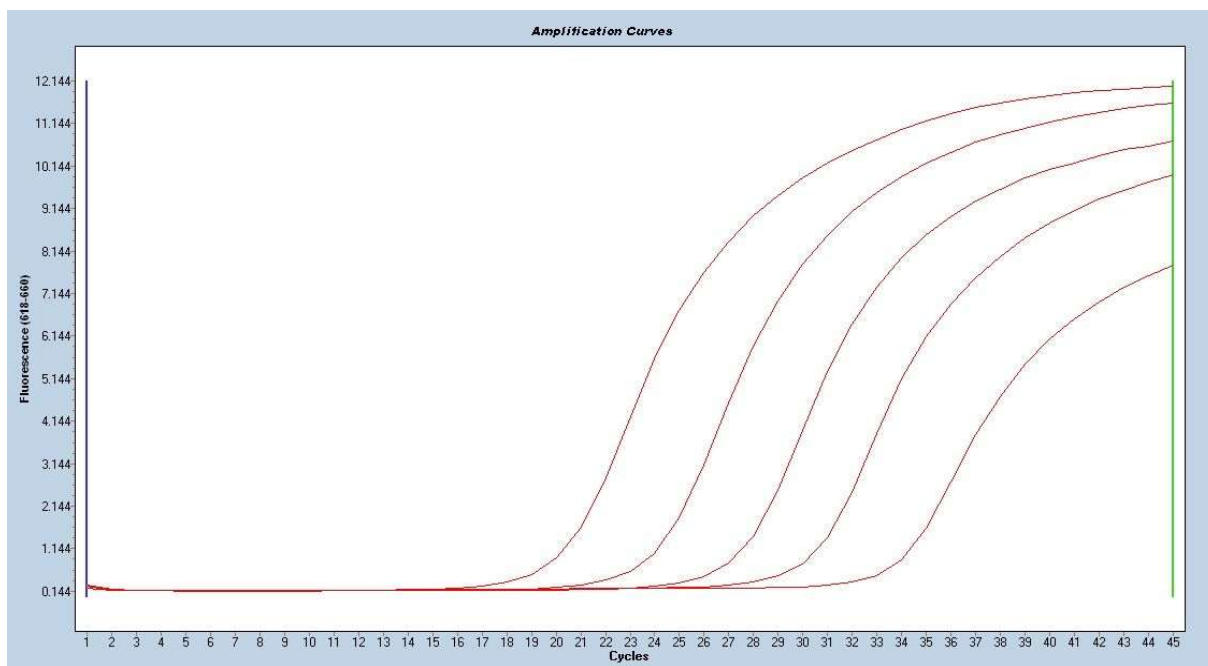
**Tabella 13:** Confronto tra i risultati relativi a *Legionella* spp. con il test RIDA®GENE Legionella e con il test PCR real-time interno di riferimento

		Test di PCR real-time interno		Totale	Commenti
		Positivo	Negativo		
RIDA®GENE Legionella	Positivo	70	0	70	Concordanza pos.: 100%
	Negativo	0	212	212	Concordanza neg.: 100%
	Totale	70	212	282	

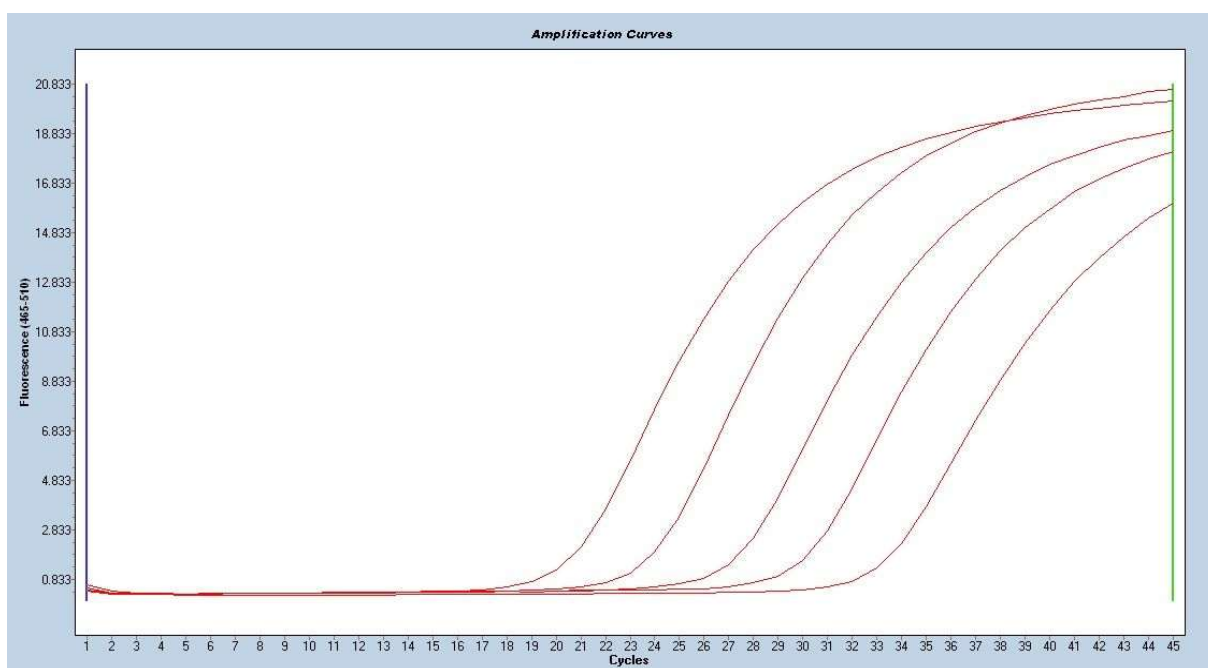
### 13.2 Sensibilità analitica

Il test PCR real time multiplex RIDA<sup>®</sup>GENE Legionella ha un limite di rivelazione di  $\geq 10$  copie di DNA per reazione.

Le figure 3 e 4 seguenti mostrano le serie di diluizioni di *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* ( $10^5$ - $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Figura 3:** Serie di diluizione del virus *Legionella* spp. ( $10^5$ - $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Figura 4:** Serie di diluizione per *Legionella pneumophila* ( $10^5$ - $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II

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

### 13.3 Specificità analitica

Il test PCR real-time multiplex RIDA® GENE Legionella è specifico per *Legionella* spp. e *L. pneumophila* da lavaggio broncoalveolare umano. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 14):

**Tabella 14:** Test di reattività crociata

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

### 13.4 Reattività analitica

La reattività del test PCR real-time multiplex RIDA®GENE Legionella è stata valutata rispetto a più ceppi di *Legionella* spp. (vedere Tabella 15). Tutti i ceppi del panel sono stati rivelati da RIDA®GENE Legionella real-time PCR.

**Tabella 15:** Test di reattività crociata










<b>Ceppo</b>	<b>Sierogruppo</b>	<b><i>Legionella</i> spp.</b>	<b><i>Legionella pneumophila</i></b>
<i>Legionella pneumophila</i>	1	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	2	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	3	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	4	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	5	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	6	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	7	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	8	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	9	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	10	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	11	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	12	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	13	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	14	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<i>Legionella anisa</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella dumoffi</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella cardiaca</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella feeleii</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella gormanii</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella hackeliae</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella jordanis</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella longbeachae</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella maceachernii</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella micdadei</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo
<i>Legionella oakridgensis</i>	-	<b>Positivo</b>	Negativo

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-07-30	Versione precedente
2020-10-02	Revisione generale 13.1 Prestazioni cliniche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

### Simboli specifici nel test

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control



## 16. Bibliografia

1. Howden BP *et al.* Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484-488.
2. Benin AL *et al.* An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237-243.
3. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis. 2012, World Health Organisation (WHO).
4. Joseph C *et al.* Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311-320.