

# REAL TIME PCR DETECTION KIT

## *C. pneumoniae, M. pneumoniae & L. pneumophila*

Handbook for the following references/  
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>C. pneumoniae, M. pneumoniae &amp; L. pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 6x8-well strips, low profile	VS-CML106L
VIASURE <i>C. pneumoniae, M. pneumoniae &amp; L. pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 6x8-well strips, high profile	VS-CML106H
VIASURE <i>C. pneumoniae, M. pneumoniae &amp; L. pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 12x8-well strips, low profile	VS-CML112L
VIASURE <i>C. pneumoniae, M. pneumoniae &amp; L. pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 12x8-well strips, high profile	VS-CML112H
VIASURE <i>C. pneumoniae, M. pneumoniae &amp; L. pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CML113L
VIASURE <i>C. pneumoniae, M. pneumoniae &amp; L. pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CML113H

VIASURE



## ENGLISH

## 1. Intended of use

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification and differentiation of human *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in clinical samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and/or *Legionella pneumophila* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and/or *Legionella pneumophila*.

## 2. Summary and Explanation

Community-acquired pneumonia (CAP) is a major respiratory disease with a high prevalence in the general population, clinical heterogeneity and variable severity. Pneumonia usually causes symptoms for 3–4 weeks, and daily activities may be impaired for a further 3 weeks on average. *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila*, are some of the causes of community-acquired pneumonia.

*Legionella pneumophila*, the bacterium responsible for Legionnaires' disease, was identified in 1976 after a large outbreak at a hotel in Philadelphia, USA. The most common form of transmission of *Legionella* is inhalation of contaminated aerosols produced in conjunction with water sprays. Infection can also occur by aspiration of contaminated water or ice, particularly in susceptible hospital patients. Legionnaires' disease has an incubation period of 2 to 10 days. Untreated Legionnaires' disease usually worsens during the first week. Combining urine antigen testing with culture or molecular assays currently provides the best algorithm for diagnosis of *Legionella* disease.

*Chlamydomphila pneumoniae* cause illness by damaging the lining of the respiratory tract (throat, windpipe, and lungs). *C. pneumoniae* respiratory infection occurs worldwide and in all age groups. The seroprevalence to *Chlamydomphila pneumoniae* is low in infants but it can be higher than 50% in adults. Seroepidemiological studies show that 50 to 75% of adults have antibodies against *Chlamydomphila pneumoniae*. Most people are infected and reinfected throughout their life. However, not everyone who is exposed to *Chlamydomphila pneumoniae* develops pneumonia. *Chlamydomphila pneumoniae* has been associated with the establishment of atherosclerotic disease and heart attacks.

*Mycoplasma pneumoniae* infection is a mild illness that is most common in young adults and school-aged children. Outbreaks of *Mycoplasma pneumoniae* occur mostly in crowded environments, when small droplets of water that contain the bacteria get into the air by coughing and sneezing while in close contact with others. The incubation period is usually between 1 to 4 weeks.

The diagnosis of CAP caused by *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* is traditionally based on cultures and serology, which have special requirements and are time-consuming.

### 3. Principle of the procedure

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in clinical samples. After DNA isolation, the identification of *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and/or *Legionella pneumophila* is performed by the amplification of a conserved region of the *argR* gene for *Chlamydomphila pneumoniae*, *CARDS* gene for *Mycoplasma pneumoniae* and *mip* gene for *Legionella pneumophila*, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on real time PCR platforms.

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. *Legionella pneumophila* DNA targets are amplified and detected in channel FAM, *Chlamydomphila pneumoniae* DNA in channel ROX, *Mycoplasma pneumoniae* DNA in channel Cy5 and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

### 4. Reagents provided

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-CML1SL/ VS-CML1SH	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 X 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CML1C	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Water RNase/DNase free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CML106L, VS-CML106H, VS-CML112L and VS-CML112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-CML1PL/ VS-CML1PH	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CML1C	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Water RNase/DNase free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-CML113L and VS-CML113H.

## 5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes materials that are required for using but not included in the VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposal gloves.

## 6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

## 7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.

- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials that have been exposed to the samples and must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## 8. Test procedure

### 8.1. DNA EXTRACTION

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of extraction kit used.

For DNA extraction from clinical samples you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions for use. We have validated the following extraction kits/systems:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- RIDA® Xtract (r-Biopharm).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

### 8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Positive Control contains high copies template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Positive Control (red vial) adding 100 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

### 8.3. PCR PROTOCOL

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run. Peel off protective aluminum seal from plates or strips.

1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up your thermocycler.

Program your thermocycler following the conditions below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (\*) through the FAM (*Legionella pneumophila*), ROX (*Chlamydomphila pneumoniae*), Cy5 (*M. pneumoniae*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

## 9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer’s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

<i>L. pneumophila</i> (FAM)	<i>C. pneumoniae</i> (ROX)	<i>M. pneumoniae</i> (Cy5)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> and <i>M. pneumoniae</i> Positive
-	-	-	+	-	+	<i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> and <i>M. pneumoniae</i> Negative
+	-	-	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> Positive, <i>C. pneumoniae</i> and <i>M. pneumoniae</i> Negative
+	+	-	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> and <i>C. pneumoniae</i> Positive, and <i>M. pneumoniae</i> Negative
+	-	+	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> and <i>M. pneumoniae</i> Positive, and <i>C. pneumoniae</i> Negative
-	+	-	+/-	-	+	<i>C. pneumoniae</i> Positive, <i>L. pneumophila</i> and <i>M. pneumoniae</i> Negative
-	+	+	+/-	-	+	<i>C. pneumoniae</i> and <i>M. pneumoniae</i> Positive, <i>L. pneumophila</i> Negative
-	-	+	+/-	-	+	<i>M. pneumoniae</i> Positive, <i>L. pneumophila</i> and <i>C. pneumoniae</i> Negative
-	-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

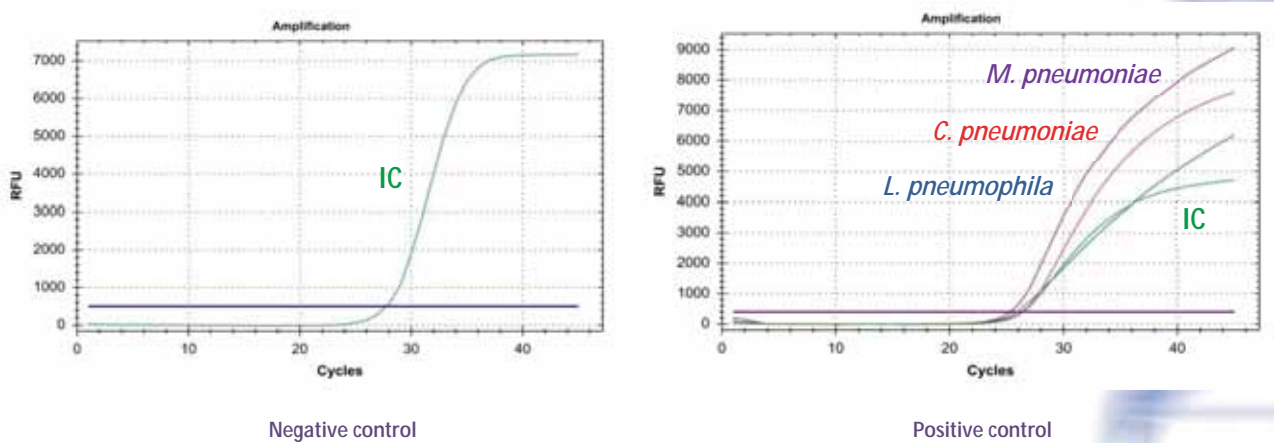
+: Amplification curve

-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

## 10. Limitations of the test

- The result of the test should be evaluated by a health care professional and evaluated in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with urine, sputum and bronchoalveolar lavage (BAL) specimens.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* and/or *M. pneumoniae*, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## 11. Quality control

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.



## 12. Performance characteristics

### 12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with 20 clinical specimens (urine, sputum and bronchoalveolar lavage) from symptomatic patients. *Legionella pneumophila* could be detected in 9 samples. Eleven specimens resulted negative for *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila*. The results were compared with those obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RIDA®GENE Legionella (R-biopharm)), showing a total concordance.

The results show a high sensitivity and specificity to detect *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* using VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit.

### 12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction for *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* (Figure 2, 3 and 4).

Figure 2. Dilution series of *Legionella pneumophila* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (FAM channel).

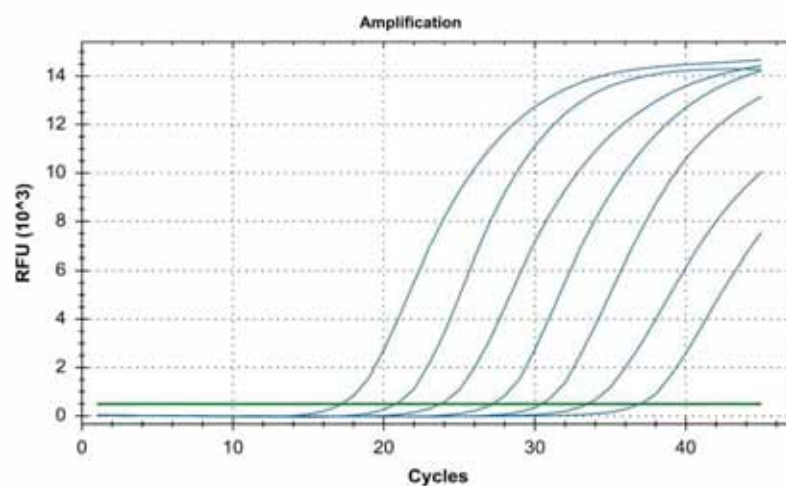


Figure 3. Dilution series of *Chlamydomphila pneumoniae* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (ROX channel).

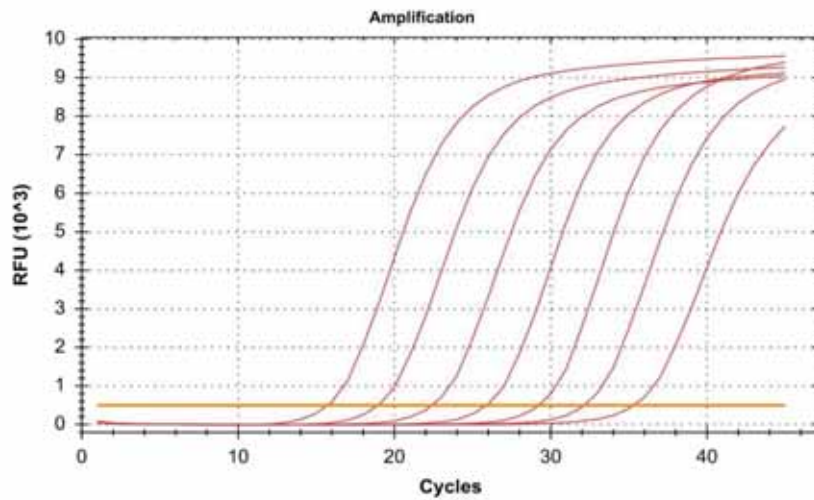
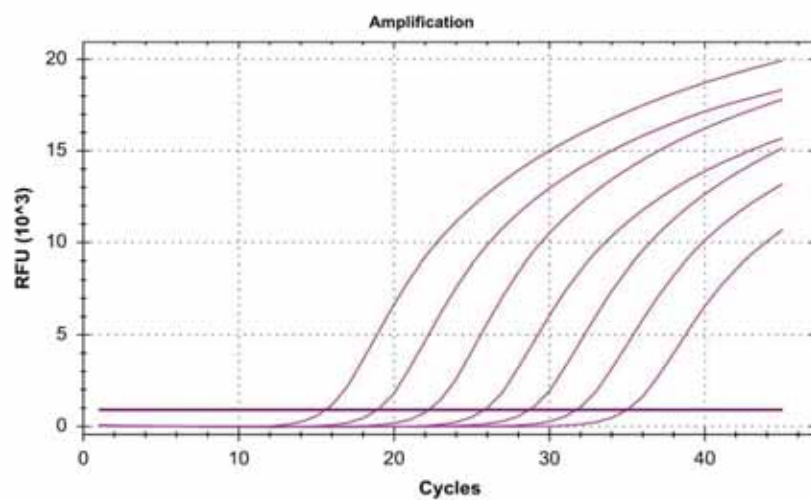


Figure 4. Dilution series of *Mycoplasma pneumoniae* ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Cy5 channel).



### 12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* and *L. pneumophila* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens.

No cross-reactivity of *Chlamydomphila pneumoniae* was detected against any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Human adenovirus	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Human bocavirus	-
Human Metapneumovirus A and B	-				

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study

No cross-reactivity of *Mycoplasma pneumoniae* was detected against any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Human Metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Human adenovirus	-
Human bocavirus	-				

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

No cross-reactivity of *Legionella pneumophila* was detected against any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Human Metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Human bocavirus	-
Human adenovirus	-				

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

#### 12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit for *Chlamydomphila pneumoniae* was evaluated against *Chlamydomphila pneumoniae* showing positive results.

The reactivity of VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit for *Mycoplasma pneumoniae* was evaluated Mycoplasma pneumoniae showing positive results.

The reactivity of VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit for *L. pneumophila* was evaluated against *Legionella pneumophila* sg1, sg3 and sg6, showing positive results.

**ANNEX 1:****COMPATIBILITY OF THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT**

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with low profile block, like systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with high or regular profile block, like systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.

\* The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

ANNEX 2:

**DETECTION CHANNELS OF MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT**

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.

## ESPAÑOL

## 1. Uso previsto

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* en muestras clínicas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Legionella pneumophila* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Legionella pneumophila*.

## 2. Introducción y explicación

La neumonía adquirida en la comunidad es una importante enfermedad respiratoria con una alta prevalencia en la población general, heterogeneidad clínica y diferentes grados de gravedad. La neumonía habitualmente produce síntomas durante 3-4 semanas, y la actividad diaria puede verse afectada durante más de 3 semanas de media. *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila*, son algunas de las causas de neumonía adquirida en la comunidad.

*Legionella pneumophila*, la bacteria responsable de la enfermedad del Legionario, fue identificada en 1976 tras un gran brote en un hotel de Philadelphia, USA. El modo de transmisión más común de *Legionella* es la inhalación de aerosoles contaminados producidos en presencia de humedad. La infección también puede producirse por aspiración de agua o hielo contaminados, particularmente en pacientes hospitalarios susceptibles. Esta enfermedad tiene un periodo de incubación de 2 a 10 días, y si no se trata suele empeorar durante la primera semana. Actualmente la combinación de tests inmunológicos en orina con cultivos o ensayos moleculares proporciona el mejor algoritmo para el diagnóstico de Legionella.

*Chlamydomphila pneumoniae* afecta al revestimiento del tracto respiratorio (garganta, tráquea y pulmones). La infección respiratoria por *Chlamydomphila pneumoniae* se produce a nivel mundial y en cualquier rango de edad. La seroprevalencia a este patógeno es baja en niños pero puede ser superior al 50% en adultos. Estudios seroepidemiológicos muestran que 50-75% de adultos tienen anticuerpos contra *Chlamydomphila pneumoniae*, y la mayoría de sufren reinfección a lo largo de su vida. Sin embargo, no todo el mundo expuesto a *Chlamydomphila pneumoniae* desarrolla neumonía. *Chlamydomphila pneumoniae* también se ha asociado con enfermedad ateromatosa y ataques al corazón.

La infección por *Mycoplasma pneumoniae* es una enfermedad leve que es más común en adultos jóvenes y niños en edad escolar. Los brotes de *Mycoplasma pneumoniae* se producen principalmente en ambientes muy

concurridos, y se transmite por aerosoles respiratorios que contienen la bacteria producidos en toses y estornudos cuando hay un contacto próximo. El período de incubación normalmente es de 1 a 4 semanas.

El diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad causada por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae* tradicionalmente se basa en cultivos y serología, que presentan requerimientos especiales y consumen mucho tiempo.

### 3. Procedimiento

---

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Legionella pneumophila* en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada de los genes *argR* para *Chlamydomphila pneumoniae*, *CARDS* para *Mycoplasma pneumoniae* y *mip* para *L. pneumophila*.

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, *Legionella pneumophila* se detecta en el canal FAM, *Chlamydomphila pneumoniae* se detecta en el canal ROX, *Mycoplasma pneumoniae* se detecta en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

### 4. Reactivos suministrados

---

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1 y Tabla 2:



Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CML1SL/ VS-CML1SH	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CML1C	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CML106L, VS-CML106H, VS-CML112L, VS-CML112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CML1PL/ VS-CML1PH	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CML1C	<i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> & <i>L. pneumophila</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CML113L y VS-CML113H.

## 5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Vórtex.

- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

## 6. Condiciones de transporte y almacenamiento

---

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

## 7. Precauciones para el usuario

---

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

## 8. Procedimiento del test

---

### 8.1. EXTRACCIÓN DE DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante, si bien, los siguientes kits/sistemas de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- RIDA® Xtract (r-Biopharm).

- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).

## 8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

El vial de *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

## 8.3. PROTOCOLO PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

### 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

### 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

### 3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (\*) a través de los canales FAM (*Legionella pneumophila*), ROX (*Chlamydomphila pneumoniae*), Cy5 (*M. pneumoniae*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

## 9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

<i>L. pneumophila</i> (FAM)	<i>C. pneumoniae</i> (ROX)	<i>M. pneumoniae</i> (Cy5)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i> Positivos
-	-	-	+	-	+	<i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i> Negativos
+	-	-	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> Positivo <i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i> Negativos
+	+	-	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> y <i>C. pneumoniae</i> Positivos, y <i>M. pneumoniae</i> Negativo
+	-	+	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> y <i>M. pneumoniae</i> Positivos, y <i>C. pneumoniae</i> Negativo
-	+	-	+/-	-	+	<i>C. pneumoniae</i> Positivo, <i>L. pneumophila</i> y <i>M. pneumoniae</i> Negativos
-	+	+	+/-	-	+	<i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i> Positivos, <i>L. pneumophila</i> Negativo
-	-	+	+/-	-	+	<i>M. pneumoniae</i> Positivo, <i>L. pneumophila</i> y <i>C. pneumoniae</i> Negativos
-	-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	+	-	Inválido

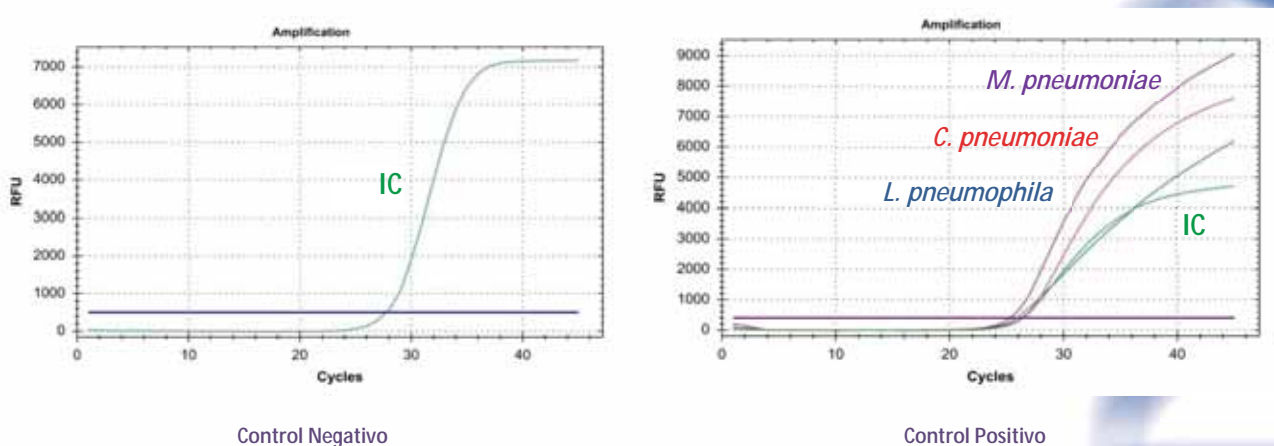
Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

## 10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras de orina, esputos y lavados broncoalveolares.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* y/o *M. pneumoniae*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

## 11. Control de calidad

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

## 12. Características del test

### 12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLINICA

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con 20 muestras clínicas (orina, esputos y lavados broncoalveolares) de pacientes sintomáticos. *Legionella pneumophila* pudo ser detectada en 9 muestras. Las 11 muestras restantes resultaron negativas para *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila*. Los resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RIDA®GENE Legionella (R-biopharm)), obteniendo una total concordancia.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* utilizando VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit.

### 12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción para *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* (Figura 2, 3 y 4).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de *Legionella pneumophila* ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

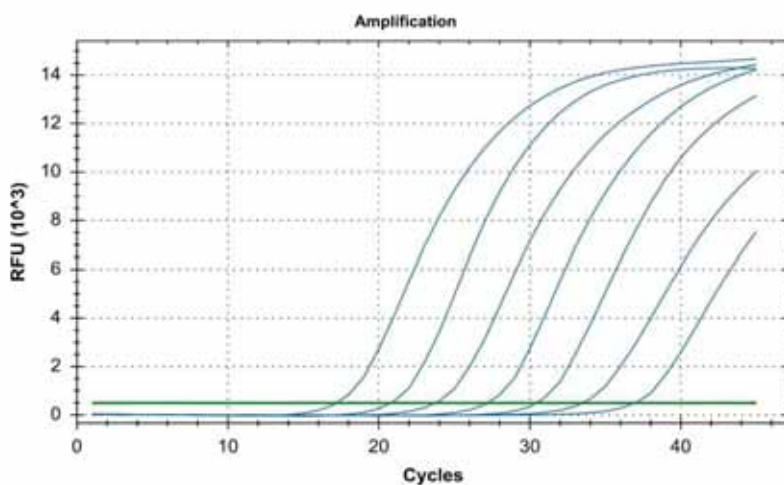


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de *Chlamydomydia pneumoniae* ( $10^7$ - $10^1$ copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).

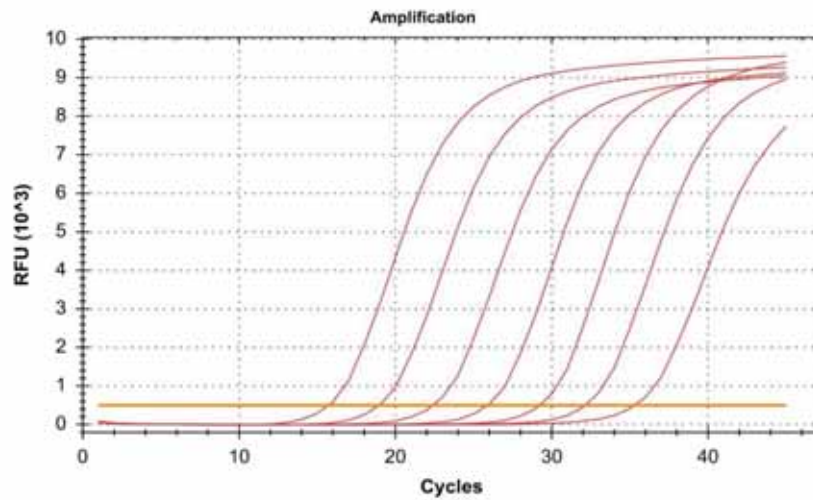
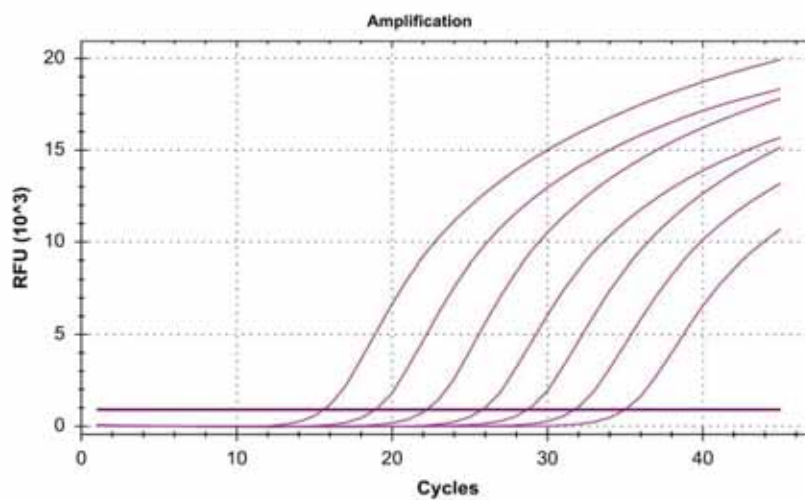


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de *Mycoplasma pneumoniae* ( $10^7$ - $10^1$ copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).



### 12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* y *L. pneumophila* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes.

No se detectan reacciones cruzadas de *Chlamydomydia pneumoniae* con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Rinovirus humano	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Metapneumovirus A y B humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Bocavirus humano	-
Adenovirus humano	-				

Tabla 5. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

No se detectan reacciones cruzadas de *Mycoplasma pneumoniae* con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Rinovirus humano	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Adenovirus humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Bocavirus humano	-
Metapneumovirus A y B humano	-				

Tabla 6. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.



No se detectan reacciones cruzadas de *Legionella pneumophila* con ninguno de los siguientes microorganismos testados

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Rinovirus humano	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Metapneumovirus A y B humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Adenovirus humano	-
Bocavirus humano	-				

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

#### 12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit para *Chlamydomphila pneumoniae* se evaluó frente a *Chlamydomphila pneumoniae* mostrando un resultado positivo.










La reactividad de VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit para *Mycoplasma pneumoniae* se evaluó frente *Mycoplasma pneumoniae* mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit para *L. pneumophila* se evaluó frente a *Legionella pneumophila* sg1, sg3 y sg6, mostrando un resultado positivo.

### 13. Bibliography/Bibliografía

1. D.A. Wilson *et al.* Detection of Legionella pneumophila by Real-Time PCR for the mip Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(7):3327-3330.
2. K.A. Thurman *et al.* Detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydomphila pneumoniae, and Legionella spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 70(1):1-9.
3. T.P. Atkinson *et al.* Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections. *FEMS Microbiology Reviews* 2008; 32(6):956-973.
4. M.H. diaz *et al.* Detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydomphila pneumoniae directly from respiratory clinical specimens using a rapid real-time polymerase chain reaction assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2012; 73(3):278-280.
5. M. Dunne *et al.* Laboratory Tests for Legionnaire’s Disease. *Infectious Disease Clinics in North America* 2016; 31(1):167-178.
6. Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/>)
7. World Health Organization (<http://www.who.int/en/>)

### 14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 <b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante	 <b>LOT</b>	Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	<b>DIL</b>	Sample diluent Diluyente de muestra	 <b>REF</b>	Catalogue number Número de referencia

## ANEXO 1:

**COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES**

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

\* El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

ANEXO 2:

**CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MAS COMUNES**

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real.

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and SmartCycler® (Cepheid). When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

---

VIASURE *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* & *L. pneumophila* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen) y SmartCycler® (Cepheid). Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ is registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.



CERTEST BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,  
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

[www.certest.es](http://www.certest.es)

