

REAL TIME PCR DETECTION KIT

Legionella + Legionella pneumophila

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

VIASURE <i>Legionella + Legionella pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-LSP106L
VIASURE <i>Legionella + Legionella pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-LSP106H
VIASURE <i>Legionella + Legionella pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-LSP112L
VIASURE <i>Legionella + Legionella pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-LSP112H
VIASURE <i>Legionella + Legionella pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-LSP113L
VIASURE <i>Legionella + Legionella pneumophila</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-LSP113H

VIASURE



ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific detection and identification of *Legionella* and *Legionella pneumophila* in clinical samples from patients with signs and symptoms of legionellosis. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of *Legionella* and *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 fluorescent reporter dye probes for *Legionella* and *Legionella pneumophila*.

2. Summary and Explanation

Legionellae are aerobic gram-negative bacteria associated with respiratory infections. To date, more than 50 *Legionella* species with 70 serogroups are known, many of which cause disease in humans. *Legionella pneumophila* is the most common pathogenic species and comprises at least 16 different serogroups. Among them, serogroup 1 (sg1) alone has been recognized as the most important agent.

Legionellae are ubiquitous in environmental water sources and may cause sporadic as well as epidemic cases, which can be nosocomial, community-acquired and travel-associated. Aerosol-generating systems such as faucets, showerheads, whirlpools, cooling towers, and nebulizers aid in the transmission of *Legionella* from water to air. Afterwards, human inhalation or aspiration of contaminated water droplets into the lower respiratory tract leads to *Legionella* infections and disease outbreaks.

Legionella pneumophila was first recognized as a disease entity from a pneumonia outbreak at a 1976 Convention of the American Legion in Philadelphia. This species accounts for up to 90% of legionellosis cases, which includes both legionnaires' disease (LD) and Pontiac fever. Legionnaires' disease presents as a pneumonia with severe multisystem involvement. Additional non-specific symptoms include fever, non-productive cough, myalgias, dyspnea and diarrhea, and neurological findings such as headache and lethargy. Pontiac fever is also characterized by malaise, myalgia, and fever; but it is a milder non-pneumonic infection.

Diagnostic delay may also result in increased mortality rates among the elderly and patients with severe underlying disease. Although culture is considered the "gold standard" for detection of *Legionella*, its growth is slow and fastidious. Therefore other strategies to ensure a rapid diagnosis have been developed. Among them, several PCR assays targeting the 16S and 5S rRNA genes, and the *macrophage infectivity potentiator* gene (*mip*) have been reported.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *Legionella* and *Legionella pneumophila* in clinical samples. After DNA isolation, the identification of *Legionella* is

performed by the amplification of a conserved region of the 23S rRNA and *Legionella pneumophila* of the *mip* gene using specific primers and fluorescent-labeled probes.

VIASURE *Legionella* + *Legionella 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 *Legionella* + *Legionella 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) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Legionella DNA targets are amplified and detected in FAM channel and *Legionella pneumophila* in Cy5 channel 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 *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-LSP1SL/ VS-LSP1SH	<i>Legionella</i> + <i>Legionella 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-LSP1C	<i>Legionella</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	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 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit with Ref: VS-LSP106L, VS-LSP106H, VS-LSP112L and VS-LSP112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-LSP1PL/ VS-LSP1PH	<i>Legionella + Legionella pneumophila</i> 96-well plate	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-LGN1C	<i>Legionella pneumophila</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	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 in VIASURE *Legionella + Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-LSP113L and VS-LSP113H.

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 *Legionella + Legionella 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:

- 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

Legionella 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 *Legionella* 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. Recommendation is to separate it 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 aluminium 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 *Legionella* 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	Polymerase activation	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*), Cy5 (*Legionella pneumophila*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channels (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ 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, validates the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for *Legionella* and *Legionella pneumophila* 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 for use.

Using the following table, read and analyse the results:

<i>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	<i>Legionella</i> and <i>Legionella pneumophila</i> Positive
-	-	+	-	+	<i>Legionella</i> and <i>Legionella pneumophila</i> Negative
+	-	+/-	-	+	<i>Legionella</i> Positive and <i>Legionella pneumophila</i> Negative
-	+	+/-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

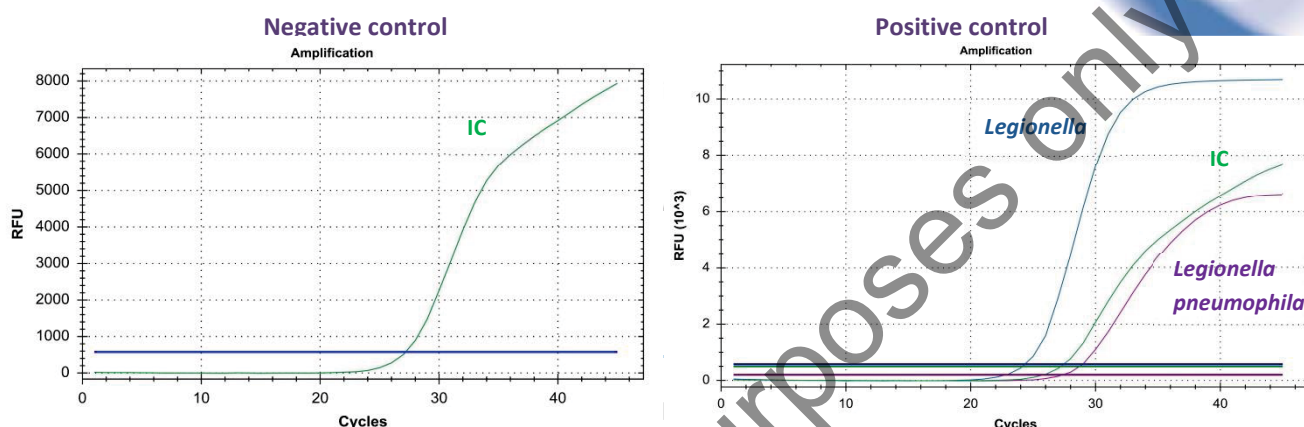
-: No amplification curve

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



medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with bronchoalveolar lavage (BAL) specimens.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens 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* and/or *Legionella pneumophila*, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Legionella* + *Legionella 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 *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with QCMD 2014 panel from *Legionella pneumophila* EQA Programme. This panel consists of 10 samples, 3 synthetic Bronchoalveolar

lavage (BAL), 2 additional BAL and 5 clinical specimens dissolved in transport medium. The results were compared with those obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RIDA®GENE *Legionella* (r-Biopharm)) and *Legionella pneumophila* 2014 EQA programme final report. All *L. pneumophila* sg1 and sg3 samples could be amplified and detected in FAM channel and in Cy5 channel. While *L. longbeachae* specimen could only be amplified and detected in FAM channel.

The results show a high sensitivity and specificity to detect *Legionella* and *Legionella pneumophila* using VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction (Figure 2 and 3).

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

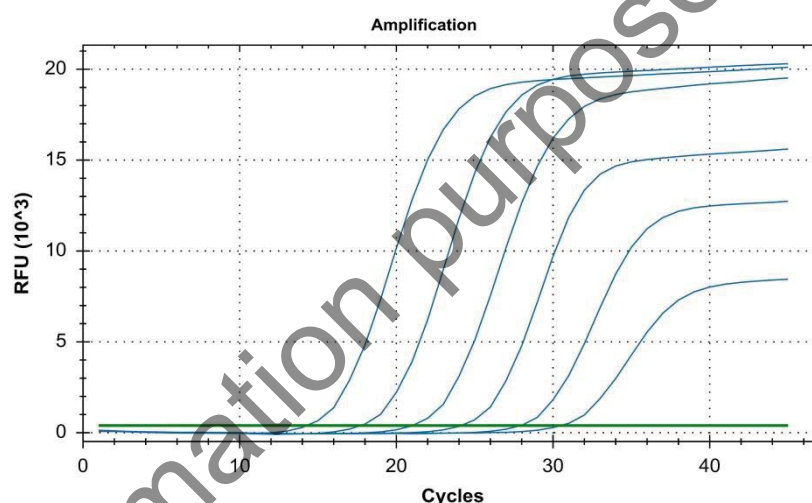
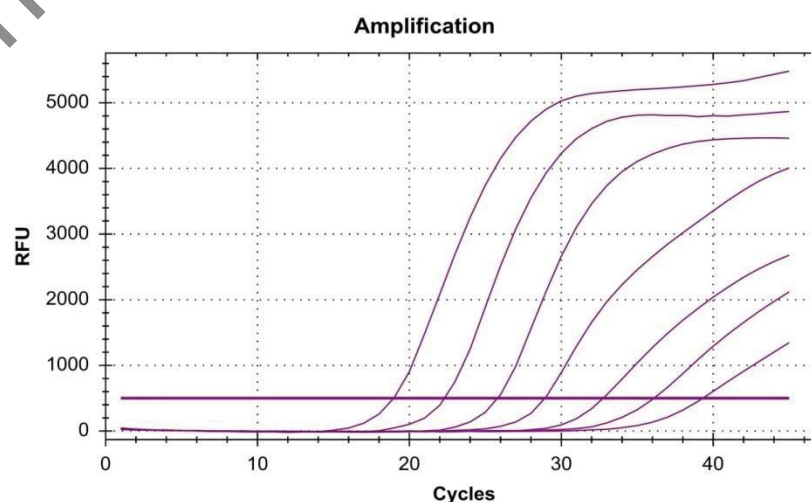


Figure 3. Dilution series of *Legionella pneumophila* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Cy5 channel).



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the *Legionella* and *Legionella pneumophila* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens.

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

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-	Respiratory Syncytial Virus (RSV)	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Human metapneumovirus A	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 virus	-	Human metapneumovirus B	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus	-	Human coronavirus 229E	-
Methillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-	Human rhinovirus	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Humano Adenovirus 5	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 Virus	-		

Table 5. 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>Haemophilus influenzae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Human metapneumovirus A	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-	Human metapneumovirus B	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-	Human rhinovirus	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	-
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Human Adenovirus 5	-

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit for *Legionella* was evaluated against *Legionella bozemanii*, *Legionella micdadei*, *Legionella dumoffii*, *Legionella longbeachae* y *Legionella sg1* y *sg3*, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit for *Legionella pneumophila* was evaluated against *Legionella pneumophila* sg1 and sg3 showing positive results.

For information purposes only

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 realplex
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	618/60	
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 *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica de *Legionella* y *Legionella pneumophila* en muestras clínicas procedentes de pacientes con signos y síntomas de legionelosis. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Legionella* y/o *Legionella pneumophila* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Legionella* y *Legionella pneumophila*.

2. Introducción y explicación

Las legionellas son bacterias aeróbicas gram-negativas que están asociadas a infecciones respiratorias. Hasta la fecha, se conocen más de 50 especies de *Legionella* con 70 serogrupos, muchos de los cuales causan enfermedades en humanos. *Legionella pneumophila* es la especie patógena más común y está formada por al menos 16 serogrupos diferentes. De los cuales, el serogrupo 1 (sg1) en sí mismo se ha reconocido como el agente más importante.

Las legionellas se encuentran en diferentes fuentes de agua medioambientales y pueden causar tanto casos esporádicos como epidemias, las cuales pueden ser nosocomiales, extrahospitalarias y asociadas a viajes. Los sistemas que generan aerosoles como grifos, duchas, bañeras de hidromasaje, torres de enfriamiento o nebulizadores favorecen la transmisión de la *Legionella* desde el agua al aire. Tras lo cual, la inhalación o aspiración de gotas de agua contaminada hacia el tracto pulmonar inferior pueden conducir a infecciones por *Legionella* y brotes epidémicos.

Legionella pneumophila fue en un principio reconocida como una entidad patológica a partir de un brote de neumonía tras la Convención de la Legión Americana en Filadelfia en el año 1976. Esta especie se considera la responsable de más del 90% de los casos de legionelosis, los cuales incluyen tanto la Enfermedad del Legionario como la fiebre de Pontiac. La enfermedad del Legionario se presenta como una neumonía con afectación multisistémica. Otros síntomas no específicos adicionales incluyen fiebre, tos no productiva, mialgias, disnea y diarreas y hallazgos neurológicos como dolor de cabeza y letargia. La fiebre de Pontiac se caracteriza también por un malestar general, mialgias y fiebre, si bien se trata de una infección no neumónica más leve.

Un diagnóstico tardío puede dar lugar a un aumento de las tasas de mortalidad en ancianos y en pacientes con enfermedades subyacentes graves. Aunque el cultivo se considera el método “gold standard” para la detección de *Legionella*, su crecimiento es lento y fastidioso. Por lo tanto, se han desarrollado otras estrategias para asegurar un diagnóstico rápido. Entre las cuales, se han reportado varios ensayos de PCR dirigidos a detectar los genes 16S y 5S rRNA y el gen codificante del potenciador de la infectividad del macrófago (*mip*).

3. Procedimiento

VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *Legionella* y *Legionella pneumophila* en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Legionella* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen 23S rRNA y para *Legionella pneumophila* con la región diana conservada del gen *mip*.

VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit utiliza 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 *Legionella* + *Legionella 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) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación de las secuencias diana de DNA de *Legionella*, *Legionella pneumophila* y del control interno, *Legionella* se detecta en el canal FAM, *Legionella pneumophila* 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 apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Legionella* + *Legionella 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-LSP1SL/ VS-LSP1SH	<i>Legionella</i> + <i>Legionella 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-LSP1C	<i>Legionella</i> Positive Control	DNA 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 *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LSP106L, VS-LSP106H, VS-LSP112L, VS-LSP112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-LSP1PL/ VS-LSP1PH	<i>Legionella</i> + <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> 96-well plate	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-LSP1C	<i>Legionella</i> Positive Control	DNA 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 *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-LSP113L y VS-LSP113H.

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 *Legionella* + *Legionella 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. Los siguientes kits 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

Legionella 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 *Legionella* 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 *Legionella* 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	Activación de la polimerasa	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*), Cy5 (*Legionella pneumophila*) 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, Applied Biosystems StepOne™ 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* y *Legionella pneumophila*. 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>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	<i>Legionella</i> y <i>Legionella pneumophila</i> Positivos
-	-	+	-	+	<i>Legionella</i> y <i>Legionella pneumophila</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	<i>Legionella</i> Positivo y <i>Legionella pneumophila</i> Negativo
-	+	+/-	-	+	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

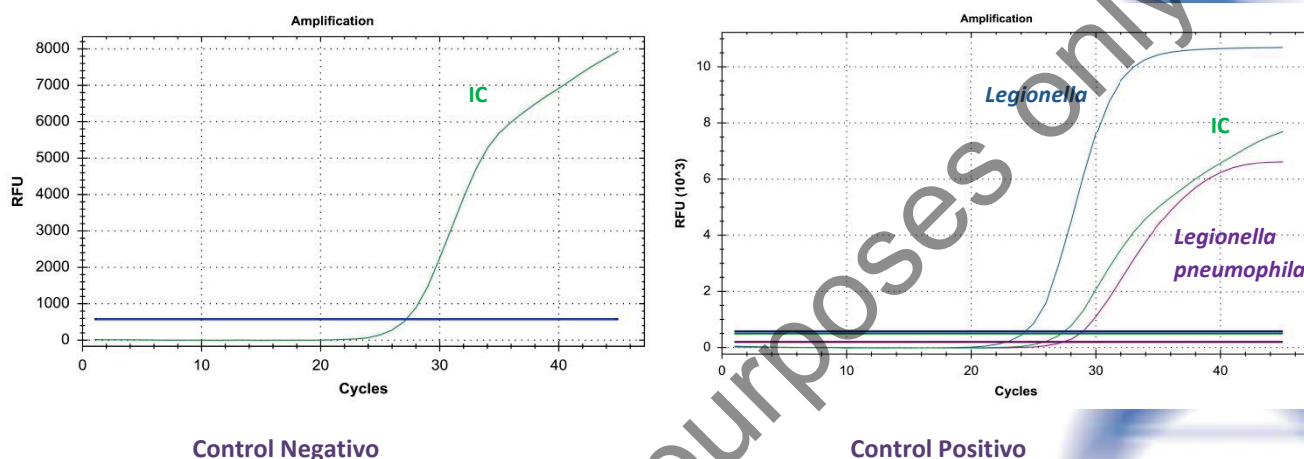
Tabla 4. Interpretación

+: 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 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 del DNA 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* y *Legionella pneumophila*, 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 *Legionella* + *Legionella 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 *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con el panel de muestras que la organización QCMD dispuso en el año 2014 para la evaluación de *Legionella pneumophila* como parte del programa de Evaluación Externa de la calidad (EEC). Este panel se compone de 10 muestras, 3 lavados broncoalveolares (LBA) sintéticos, 2 LBA adicionales y 5 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte. Los resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RIDA®GENE *Legionella* (r-Biopharm)) y el informe final del programa EEC para la detección de *Legionella pneumophila* en el año 2014. Todas las muestras de *L. pneumophila* sg1 y sg3 pudieron ser amplificadas y detectadas en los canales FAM y Cy5. Mientras que la muestra de *L. longbeachae* pudo ser amplificada y detectada en el canal FAM.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Legionella* y *Legionella pneumophila* utilizando VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción (Figura 2 y 3).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de *Legionella* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX95 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

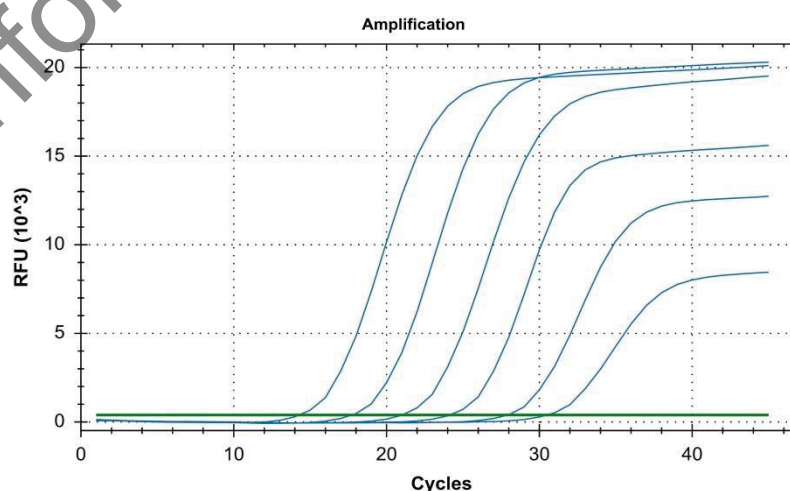
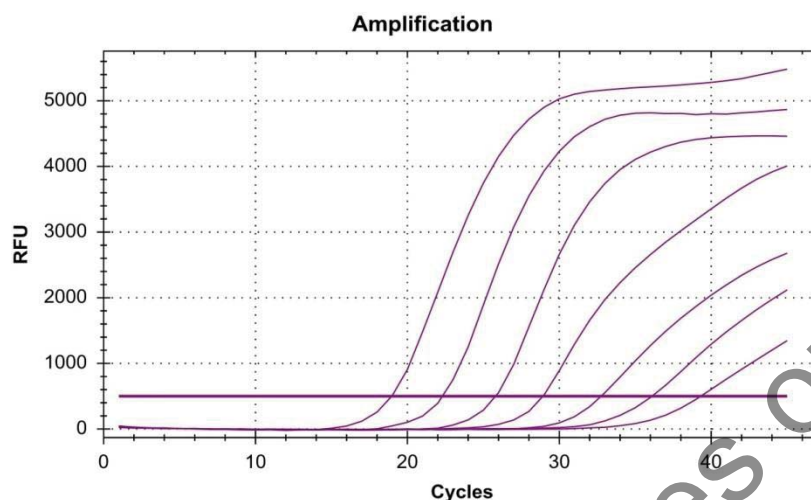


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de *Legionella pneumophila* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Canal Cy5).



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

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

No se detectaron reacciones cruzadas de *Legionella* con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Metapneumovirus A humano	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Metapneumovirus B humano	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	-	Rinovirus humano	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-	Adenovirus humano 2 cepa Adenoide 6	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Adenovirus humano 5	-
Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4	-		

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

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Metapneumovirus A humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	Metapneumovirus B humano	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/California/7/Virus 2009(H1N1)	-	Rinovirus humano	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Adenovirus humano 2 cepa Adenoide 6	-
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Influenza B/Florida/04/06	-	Adenovirus humano 5	-

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

12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit para *Legionella* se evaluó frente a *Legionella bozemanii*, *Legionella micdadei*, *Legionella dumoffii*, *Legionella longbeachae* y *Legionella* sg1 y sg3, mostrando unos resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit para *Legionella pneumophila* se evaluó frente a *Legionella pneumophila* sg1 y sg3, 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. N. Phin *et al.* Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infectious Diseases* 2014; 14(10): 1011-1021.
3. B.M. Diederich *et al.* *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* 2008; 56(1): 1-12.
4. A. Støhlhaug and K. Bergh. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by *mip* sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72(9): 6394-6398.
5. E.J. Nazarian *et al.* Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008; 62(2): 125-132.

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

 IVD	<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	 LOT	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		Sample diluent Diluyente de muestra	 REF	Catalogue number Número de referencia

For information purposes only

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 realplex
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	618/60	
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 *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, AriaMx Realtime PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and SmartCycler® (Cepheid). When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommended to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *Legionella* + *Legionella pneumophila* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, AriaMx Realtime PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers, 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™, StepOnePlus™ and ViiA™ are 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

