

# Vitassay qPCR

## Primary Atypical Pneumonia

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* en muestras respiratorias

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of human *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in respiratory samples



ES

EN

## Uso previsto

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia, permite la detección y diferenciación específica de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* en muestras respiratorias. El uso previsto del test es con fines de investigación, sin ningún objetivo médico, no se consideran dispositivos para la evaluación del rendimiento.

## Referencias

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4 x 8-well strip, low profile	7041049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4 x 8-well strip, high profile	7042049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8 x 8-well strip, low profile	7081049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8 x 8-well strip, high profile	7082049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, low profile	7091049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, high profile	7092049R

## Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041049R, 7042049R, 7081049R y 7082049R:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S049R/ 7042S049R	Primary Atypical Pneumonia strips	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7C049R	Primary Atypical Pneumonia Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4/8 tiras de 8 tapones

Reactivos suministrados para las referencias 7091049R y 7092049R:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P049R/ 7092P049R	Primary Atypical Pneumonia Plate	-	1 placa
7C049R	Primary Atypical Pneumonia Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	12 tiras de 8 tapones

## Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

## Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

La neumonía es una infección pulmonar que puede causar enfermedades leves o graves en personas de todas las edades. La neumonía adquirida en la comunidad (CAP) es una infección adquirida en la comunidad, fuera del entorno hospitalario, que se asocia con altas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Las bacterias intracelulares son causas comunes de CAP y algunas bien establecidas son *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*.

El género *Legionella* incluye bacterias gramnegativas que viven en sistemas de agua naturales y artificiales. Hasta la fecha, se conocen unas 60 especies de *Legionella*. *Legionella pneumophila* (*Lpn*) es la especie más frecuentemente asociada con la enfermedad humana e incluye 16 serogrupos.

La forma más común de transmisión de *Legionella* es la inhalación de aerosoles contaminados. La aerosolización de los suministros de agua contaminada permite que la bacteria sea inhalada en el pulmón humano, donde *Lpn* puede ser fagocitada por los macrófagos alveolares y replicarse intracelularmente. No hay transmisión directa de humano a humano.

Se cree que la mayoría de las infecciones por *Legionella* son asintomáticas o conducen a una enfermedad respiratoria leve y autolimitada (forma no neumónica). Sin embargo, algunos individuos, particularmente ancianos y aquellos con sistemas inmunes debilitados o enfermedades pulmonares crónicas, tienen un mayor riesgo de desarrollar

neumonía severa (enfermedad del legionario). De los casos reportados, 75-80% son mayores de 50 años y 60-70% son hombres.

La forma no neumónica tiene un período de incubación de unas pocas y hasta 48 horas y los síntomas principales son fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, malestar y dolor muscular (mialgia). Los principales síntomas de la enfermedad del legionario son fiebre, tos leve, flema, falta de aliento, pérdida de apetito, dolor de cabeza, malestar y letargo. Algunos pacientes también pueden tener dolor muscular, diarrea y confusión. Los síntomas generalmente comienzan de 2 a 10 días después de la exposición a la bacteria, pero pueden demorar más.

Con más de 100 especies diferentes, el género *Mycoplasma* es una bacteria única que carece de una pared celular y causa una amplia gama de síntomas e infecciones. *Mycoplasma pneumoniae* (MP) es la especie patógena más común del género *Mycoplasma* que infecta a los humanos. La MP es una bacteria respiratoria atípica que afecta principalmente el revestimiento del sistema respiratorio (garganta, pulmones, tráquea) en niños y adultos de todas las edades. MP causa hasta el 40% de la CAP en niños y aproximadamente el 18% de las infecciones que requieren hospitalización.

*M. pneumoniae* se transmite de persona a persona al toser o estornudar, lo que crea pequeñas gotas respiratorias en el aire que contienen las bacterias que otras personas respiran. Una vez en el cuerpo, los síntomas generalmente comienzan entre 1 y 4 semanas.

El tipo de enfermedad más común, especialmente en niños es la traqueobronquitis, conocida como resfriado de pecho, cuyos síntomas comunes incluyen dolor de garganta, fatiga, fiebre, tos que empeora lentamente y puede durar semanas o meses y dolor de cabeza. Los expertos han estimado que 1 de cada 10 personas que se enferman de MP sufren neumonía cuyos síntomas incluyen tos que puede producir moco, fiebre, escalofríos, dificultad para respirar, dolor en el pecho y fatiga.

*Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*), también conocida como *Chlamydia pneumoniae*, es una bacteria del género *Chlamydia* que puede causar infecciones del tracto respiratorio, como CAP. *C. pneumoniae* representa del 6 al 20% de los casos de CAP, dependiendo de factores como el entorno de la población, el grupo de edad y los métodos de diagnóstico utilizados. La bacteria afecta el revestimiento del tracto respiratorio, incluida la garganta, la tráquea y los pulmones, y puede causar infección crónica y contribuir a afecciones crónicas, como asma, artritis y aterosclerosis.

La forma más común de transmisión es directa de humano a humano. Las personas transmiten *C. pneumoniae* al toser o estornudar, lo que crea pequeñas gotas respiratorias que contienen la bacteria y otras personas en contacto cercano respiran la bacteria. Las personas también pueden enfermarse si tocan algo con gotas de una persona enferma y luego se tocan la boca o la nariz.

*C. pneumoniae* afecta a personas de todas las edades, aunque con mayor frecuencia infecta por primera vez cuando son niños en edad escolar o adultos jóvenes. Los adultos mayores tienen un mayor riesgo de enfermedad grave, incluida la neumonía, y en ellos la reinfección es más común.

En general, la infección por *C. pneumoniae* es una enfermedad leve que con mayor frecuencia causa una infección del tracto respiratorio superior, cuyos síntomas pueden incluir dolor de garganta, secreción o congestión nasal, fatiga, fiebre leve, ronquera o pérdida de voz, tos que empeora lentamente y dolor de cabeza. *C. pneumoniae* también puede causar infecciones del tracto respiratorio inferior como bronquitis e infecciones pulmonares como la neumonía. Los síntomas generalmente comienzan de 3 a 4 semanas después de la exposición.

### **Principio del test**

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *argR* (*Chlamydophila pneumoniae*), *CARDS* (*Mycoplasma pneumoniae*) y *mip* (*L. pneumophila*). Tras la extracción de DNA, la presencia de *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Legionella pneumophila* se detecta mediante un aumento de fluorescencia durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' nucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'-3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia, se trata de un ensayo listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana de *Legionella pneumophila* es detectada en el canal FAM, la amplificación de la secuencia diana de *Chlamydophila pneumoniae* es detectada en el canal ROX, la amplificación de la secuencia diana de *Mycoplasma pneumoniae* es detectada en el canal Cy5 mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

### **Precauciones**

- Diseñado para uso en investigación.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

## **Procedimiento**

### **Toma de muestra, preparación y extracción de DNA**

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

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

ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)

NX-48 Bacterial DNA Kit, utilizando Nextractor® NX-48 system (Genolution)

MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado COBAS® AmpliPrep (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

### Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Primary Atypical Pneumonia Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

### Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

### Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (*Legionella pneumophila*), HEX, JOE o VIC (Control Interno), ROX (*Chlamydomphila pneumoniae*) y Cy5 (*M. pneumoniae*). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3005P™ (ver Adjunto II).

## **Análisis e interpretación de resultados**

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.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

### **Control positivo**

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los FAM (*L. pneumophila*), HEX, JOE o VIC (Control Interno), ROX (*C. pneumoniae*) y Cy5 (*M. pneumoniae*).

### **Control negativo**

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, ROX, HEX y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Con la ayuda de la siguiente tabla, 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.</i> <i>pneumoniae</i> y <i>M.</i> <i>pneumoniae</i> Negativos
+	+	-	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> y <i>C. pneumoniae</i> Positivos, y <i>M.</i> <i>pneumoniae</i> Negativo
+	-	+	+/-	-	+	<i>L. pneumophila</i> y <i>M. pneumoniae</i> Positivos, y <i>C.</i> <i>pneumoniae</i> Negativo
-	+	-	+/-	-	+	<i>C. pneumoniae</i> Positivo, <i>L.</i> <i>pneumophila</i> y <i>M.</i> <i>pneumoniae</i> Negativos
-	+	+	+/-	-	+	<i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i> Positivos, <i>L.</i> <i>pneumophila</i> Negativo
-	-	+	+/-	-	+	<i>M. pneumoniae</i> Positivo, <i>L.</i> <i>pneumophila</i> y <i>C.</i> <i>pneumoniae</i> Negativos
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	+	Inválido

**Positivo (+):** Señal de amplificación

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación

Si no se detecta señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal en el control negativo, el experimento se considera fallido.

Si las muestras negativas para todos los patógenos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

## **Control de Calidad**

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI). Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

## **Resultados preliminares de las características técnicas**

### **Sensibilidad y especificidad clínica**

Un total de 90 muestras respiratorias fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia y (FTD Bacterial pneumonia CAP (Fast Track Diagnostics).

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia detectó *C. pneumoniae* en 5 muestras positivas, *M. pneumoniae* en 4 muestras positivas y *L. pneumophila* en 1 muestras positivas. Se obtuvieron 1 muestras discordantes (muestras cercanas al límite de detección) en *M. pneumoniae*.

Estos resultados muestran la elevada sensibilidad y especificidad para detectar *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* y *L. pneumophila* del test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia.

### **Sensibilidad analítica**

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes patógenos ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción.

### **Especificidad analítica**

La especificidad analítica para la detección de las enfermedades de transmisión sexual fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes patógenos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

## Reactividad analítica

Primary Atypical Pneumonia		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Chlamydia caviae</i>	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Legionella bozemanii</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Virus Parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	Metapneumovirus humano A y B
<i>Legionella dumoffii</i>	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	Coronavirus humano 229E
<i>Legionella longbeache</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	MERS Coronavirus
<i>Legionella hackeliae</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	Rhinovirus humano
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Adenovirus humano
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	Virus respiratorio sincitial (RSV A y RSV B)
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	Human Bocavirus humano

La reactividad de Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia, para *Chlamydia pneumoniae* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Chlamydia pneumoniae*, como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia, para *Mycoplasma pneumoniae* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Mycoplasma pneumoniae* como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia, para *L. pneumophila* fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando *Legionella pneumophila* sg1 (ST47) y (ST62), sg2-14, sg3, y sg6, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. 1979 cepa Philadelphia-1, sg 1, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. cepa Togus-1, sg 2, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. cepa Bloomington-2, sg 3, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. cepa Concord 3, sg 8, *Legionella pneumophila* subsp. *fraseri*

Brenner *et al.* 1989 cepa Los Angeles-1, sg 4, *Legionella pneumophila* subsp. *fraseri*  
Brenner *et al.* 1989 cepa Dallas 1E, sg 5 como molde.

### **Termocicladores compatibles**

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>

I: Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a tubos específicos del equipo.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

### **Limitaciones**

- La prueba debe usarse con fines RUO (uso exclusivo en investigación), sin ningún objetivo médico.
- 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 humanas. 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 los diferentes patógenos, 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.

## Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

\* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

## Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

<b>Termociclador</b>	<b>Canal Vitassay</b>	<b>Valor de exposición</b>
<b>DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## Intended use

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia allows the detection and differentiation of *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* by real-time PCR in respiratory samples. This test is intended to be used for research purposes, without any medical objective is not regarded as devices for performance evaluation.

## References

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4 x 8-well strip, low profile	7041049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4 x 8-well strip, high profile	7042049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8 x 8-well strip, low profile	7081049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8 x 8-well strip, high profile	7082049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, low profile	7091049R
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, high profile	7092049R

## Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041049R, 7042049R, 7081049R and 7082049R:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S049R/ 7042S049R	Primary Atypical Pneumonia strips	-	4/8 x 8-well strip
7C049R	Primary Atypical Pneumonia Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Rehydration Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4/8 x 8 cap strip

Reagents provided in references 7091049R and 7092049R:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P049R/ 7092P049R	Primary Atypical Pneumonia Plate	-	1 plate
7C049R	Primary Atypical Pneumonia Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Rehydration Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	12 x 8 cap strip



## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

## Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

Pneumonia is an infection of the lungs that can cause mild to severe illness in people of all ages. Community-acquired pneumonia (CAP) is an infection acquired in the community, outside of the hospital setting, which is associated with high rates of morbidity and mortality worldwide. Intracellular bacteria are common causes of CAP. Some intracellular pathogens that are well established as causes of pneumonia are *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*.

The genus *Legionella* includes Gram-negative microorganisms living in natural and artificial water systems. To date, about 60 species of *Legionella* are known. *Legionella pneumophila* (*Lpn*) is the species most frequently associated with human disease and includes 16 serogroups.

The most common form of transmission of *Legionella* is inhalation of contaminated aerosols. Aerosolization of contaminated water supplies allows the bacteria to be inhaled into the human lung, where *L. pneumophila* can be phagocytosed by alveolar macrophages and replicate intracellularly. There is no direct human-to-human transmission.

Most *Legionella* infections are thought to be asymptomatic or lead to a self-limiting and mild respiratory disease (non-pneumonic form). However, some individuals, particularly the elderly and those with weakened immune systems or chronic lung diseases, are at

increased risk of developing severe pneumonia (Legionnaires' disease). Of the reported cases 75–80% are over 50 years and 60–70% are male.

The non-pneumonic form has an incubation period from a few and up to 48 hours and the main symptoms are fever, chills, headache, malaise and muscle pain (myalgia). The main symptoms of Legionnaires' disease are fever, mild cough, phlegm, shortness of breath, loss of appetite, headache, malaise and lethargy. Some patients may also have muscle pain, diarrhoea and confusion. Symptoms usually begin 2 to 10 days after being exposed to the bacteria, but it can take longer.

With over 100 different species, the genus *Mycoplasma* is a unique bacterium that lacks a cell wall and causes a wide range of symptoms and infections. *Mycoplasma pneumoniae* (MP) is the most common pathogenic species of the genus *Mycoplasma* infecting humans. MP is an atypical respiratory bacterium that mainly affects the lining of the respiratory system (throat, lungs, windpipe) in children and adults of all ages. MP causes up to 40% of community-acquired pneumonia (CAP) in children and about 18% of infections in patients requiring hospitalization.

*M. pneumoniae* spread from person to person by coughing or sneezing, which creates small respiratory droplets in the air that contain the bacteria which other people then breathe in. Once in the body, symptoms usually begin between 1 to 4 weeks.

The most common type of illness, especially in children, is tracheobronchitis, commonly known as a chest cold. Common symptoms of a chest cold include sore throat, fatigue, fever, slowly worsening cough that can last for weeks or months and headache. Experts have estimated that up to 1 in 10 people who get ill from MP get pneumonia. Common symptoms of pneumonia include cough that may produce mucus, fever, chills, shortness of breath, chest pain and fatigue.

*Chlamydophila pneumoniae* (*C. pneumoniae*), also known as *Chlamydia pneumoniae*, is a type of bacteria of the genus *Chlamydia* that can cause respiratory tract infections, such as CAP. *C. pneumoniae* accounts for 6 to 20% of CAP cases, depending on several factors such as setting of the studied population, age group examined, and diagnostic methods used. The bacteria affect the lining of the respiratory tract including the throat, windpipe, and lungs and can cause chronic infection which might contribute to chronic conditions, such as asthma, arthritis and atherosclerosis.

The most common form of transmission is direct human-to-human. People spread *C. pneumoniae* by coughing or sneezing, which creates small respiratory droplets that contain the bacteria. Other people in close contact then breathe in the bacteria. People can also get sick if they touch something with droplets from a sick person on it and then touch their mouth or nose.

People of all ages can get sick from *C. pneumoniae*. It most commonly infects people for the first time when they are school-aged children or young adults. However, older adults are at increased risk for severe disease caused by *C. pneumoniae* infection, including pneumonia and reinfection is most common in older adults.

In general, *C. pneumoniae* infection is a mild illness that most commonly causes an upper respiratory tract infection which symptoms can include a sore throat, runny or stuffy nose, fatigue, low-grade fever, hoarseness or loss of voice, slowly worsening cough and headache. *C. pneumoniae* can also cause lower respiratory tract infections like bronchitis and lung infections like pneumonia. Symptoms usually begin 3 to 4 weeks after exposure.

### **Principle of the test**

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *argR* gene (*Chlamydomphila pneumoniae*), *CARD5* (*Mycoplasma pneumoniae*) and *mip* (*L. pneumophila*). It is detected by an increment in the fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' nuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia is a ready-to used test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the *Legionella pneumophila* is detected through the FAM channel, the amplification of the *Chlamydomphila pneumoniae* is detected through the ROX channel, the amplification of the *Mycoplasma pneumoniae* is detected through the Cy5 channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

### **Precautions**

- For Research Use Only.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.

- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

## **Procedures**

### **Specimen collection, processing and DNA extraction**

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

NX-48 Bacterial DNA Kit, using the Nexttractor® NX-48 system (Genolution).

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, using COBAS® AmpliPrep (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

### **Positive control preparation**

Reconstitute the lyophilized Primary Atypical Pneumonia Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components.

### Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

### Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (*Legionella pneumophila*), HEX, JOE o VIC (Internal Control), ROX (*Chlamydomphila pneumoniae*) and Cy5 (*M. pneumoniae*). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (Attached II).

### Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer’s instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

**Positive control**

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (*Legionella pneumophila*), HEX, JOE o VIC (Internal Control), ROX (*Chlamydomphila pneumoniae*) and Cy5 (*M. pneumoniae*), which validates the reaction.

**Negative control**

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX, HEX and Cy5 which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table

<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

**(+) Positive:** Amplification signal

**(-) Negative:** No amplification signal

If no amplification signal is detected in the negative control and / or no signal is present in the negative control, the experiment is considered unsuccessful.

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

### **Quality Control**

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

### **Preliminary results of the test characteristics**

#### **Clinical sensitivity and specificity**

A total of 90 respiratory samples were analysed by Vitassay strip qPCR Primary Atypical Pneumonia and (FTD Bacterial pneumonia CAP (Fast Track Diagnostics).

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia detected *C. pneumoniae* in 5 positive samples, *M. pneumoniae* in 4 positive samples y *L. pneumophila* in 1 positive sample.

1 discordant sample (samples determined at the limit of detection) were obtained in *M. pneumoniae*.

These results show the high sensitivity and specificity to detect *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* and *L. pneumophila* using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia.

#### **Analytical sensitivity**

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of the template DNA of the different pathogens ( $10^7$ - $10^1$  copies / reaction). This assay has a limit of detection of  $\geq 10$  copies of DNA per reaction.

#### **Analytical specificity**

The analytical specificity for Primary Atypical Pneumonia was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:



## Analytical reactivity

Primary Atypical Pneumonia		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza B/Florida/04/06 virus
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus
<i>Legionella bozemanii</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
<i>Legionella micdadei</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	Human metapneumovirus A and B
<i>Legionella dumoffii</i>	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	Human coronavirus 229E
<i>Legionella longbeache</i>	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	MERS Coronavirus
<i>Legionella hackeliae</i>	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	Human rhinovirus
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	Human Adenovirus
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus	Respiratory Syncytial virus (RSV A and RSV B)
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	Human Bocavirus

The reactivity of Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia for *Chlamydomphila pneumoniae* was confirmed by the real time amplification using *Chlamydomphila pneumoniae*, as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia for *Mycoplasma pneumoniae* was confirmed by the real time amplification using *Mycoplasma pneumoniae* as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia for *L. pneumophila* was confirmed by the real time amplification using *Legionella pneumophila* sg1 (ST47) and (ST62), sg2-14, sg3, and sg6, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. 1979 strain Philadelphia-1, sg 1, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. strain Togus-1, sg 2, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. strain Bloomingtoon-2, sg 3, *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Brenner et al. strain Concord 3, sg 8, *Legionella pneumophila* subsp. *fraseri* Brenner et al. 1989 strain

Los Angeles-1, sg 4, *Legionella pneumophila* subsp. fraseri Brenner et al. 1989 strain Dallas 1E, sg 5, as templates.

### **Compatibles real-time PCR equipment**

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>

I: For Rotor-Gene® Q thermocycler the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

### **Limitations**

- The test must be used for RUO purposes (Exclusive Use in Research), without any medical objective.
- 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 positives due to cross-contamination with different pathogens, either by samples containing high concentrations of target template DNA or by carryover contamination from PCR products from previous reactions.

## Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	<b>Analytik Jena Biometra</b>
<b>Bio-Rad</b>	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	<b>BIONEER</b>
<b>Cepheid</b>	Exicycler™ 96
SmartCycler®	<b>Bio-Rad</b>
<b>Qiagen</b>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers
	<b>Eppendorf</b>
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene® Q
	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

\* See Attached III to configure exposure settings.

## Attached II: 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 the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
<b>DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## Bibliography/Bibliografía

1. Lanks CW, Musani AI, Hsia DW. (2019) Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *Med Clin North Am.* 103(3):487-501.
2. Cillóniz C, Torres A, Niederman M, et al. (2016). Community-acquired pneumonia related to intracellular pathogens. *Intensive Care Med.* 42(9):1374-1386.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Available from <https://www.cdc.gov/pneumonia/> & <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/> Accessed Jun 2020
4. World Health Organization. Legionellosis. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis> Accessed Jun 2020
5. Liu X, Shin S. (2019). Viewing Legionella pneumophila Pathogenesis through an Immunological Lens. *J Mol Biol.* 431(21):4321-4344.
6. Montagna MT, De Giglio O, Napoli C, et al. (2018). Control and prevention measures for legionellosis in hospitals: A cross-sectional survey in Italy. *Environ Res.* 166:55-60.
7. Chaudhry R, Ghosh A, Chandolia A. (2016). Pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae: An update. *Indian J Med Microbiol.* 34(1):7-16.
8. Lanao AE, Chakraborty RK, Pearson-Shaver AL. (2020). Mycoplasma Infections. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 29.
9. Medjo B, Atanaskovic-Markovic M, Radic S, Nikolic D, Lukac M, Djukic S. (2014). Mycoplasma pneumoniae as a causative agent of community-acquired pneumonia in children: clinical features and laboratory diagnosis. *Ital J Pediatr.* 40:104. Published Dec 18.
10. Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. (2009). Chlamydia pneumoniae. *Clin Microbiol Infect.* 15(1):29-35.
11. Blasi F, Tarsia P, Aliberti S, Cosentini R, Allegra L. (2005). Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae. *Semin Respir Crit Care Med.* 26(6):617-624.

## Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.









Mx3000P™ and Mx3005™ 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.

## Symbols for components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos

	Almacenar en lugar seco Keep dry		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Fabricante Manufacturer
	Fecha de caducidad Use by		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
	Número de lote Lot number		Número de referencia Catalogue number
DIL	Diluyente de muestra Buffer Sample diluent		



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa  
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)