

Vitassay

Real-Time PCR Kits

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia

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

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

*El Organismo Notificado 0318 solo interviene en la identificación de *Chlamydomphila pneumoniae*

*The Notified Body 0318 is only involved in the identification of *Chlamydomphila pneumoniae*

 
0318*



Uso previsto

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia permite la detección y diferenciación específica de *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* mediante PCR en tiempo real en muestras respiratorias procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria. El uso previsto de la prueba es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y/o *Legionella pneumophila*.

Referencias

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4x8-well strip, low profile	7041049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4x8-well strip, high profile	7042049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8x8-well strip, low profile	7081049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8x8-well strip, high profile	7082049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, low profile	7091049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, high profile	7092049

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041049, 7042049, 7081049 y 7082049:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S049/ 7042S049	Primary Atypical Pneumonia strips low/high profile	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7C049	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

Para las referencias 7091049 y 7092049:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P049/ 7092P049	Primary Atypical Pneumonia Plate low/high profile	-	1 placa
7C049	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

Material y equipamiento necesario, 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

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.

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.

Chlamydia 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 de la prueba

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

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos oligonucleótidos específicos (*primers*) y una sonda de hidrolisis marcada con fluorescencia 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 una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Los canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Diana	Canal detección
<i>Legionella pneumophila</i>	FAM
Control Interno (CI)	HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	ROX
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- 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 o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso.
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- El producto Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia solamente se ha validado con los equipos mencionados en el Apartado Termocicladores compatibles de estas Instrucciones de uso. El resto de los equipos de PCR a tiempo real compatibles indicados en el Anexo 1 se basan en datos bibliográficos.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Según la literatura, se pueden analizar muestras respiratorias de pacientes sintomáticos (es decir, esputo, lavado broncoalveolar, aspirado bronquial, hisopo nasal, hisopo faríngeo, hisopo nasofaríngeo, hisopo amigdalario faríngeo, hisopo pernasal, aspirado nasofaríngeo y líquido pleural).

En general, las muestras respiratorias se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (según el tipo de muestra), y ser procesadas a la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Los especímenes transportados un tiempo de duración mayor de 48 horas, se recomienda realizar el envío a -70°C o menos. Las muestras pueden almacenarse entre $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta 48 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -70°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Extracción de DNA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos se puede utilizar un sistema manual o automático optimizado compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek molecular).
- 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).

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) o 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
Desnaturalización inicial	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 (*Mycoplasma pneumoniae*). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación comprobar la emisión de la señal del control interno.

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 ($Ct \leq 40$) en los canales FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($Ct \geq 40$ o no señal) de FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo y/o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

Legionella pneumophila (FAM)	Chlamydophila pneumoniae (ROX)	Mycoplasma pneumoniae (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación
+	+	+	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> , <i>Chlamydophila pneumoniae</i> y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> detectadas
-	-	-	+	<i>Legionella pneumophila</i> , <i>Chlamydophila pneumoniae</i> y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> no detectadas
+	-	-	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> detectada <i>Chlamydophila pneumoniae</i> y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> no detectadas
+	+	-	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> y <i>Chlamydophila pneumoniae</i> detectadas, y <i>M. pneumoniae</i> no detectada
+	-	+	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> detectadas, y <i>Chlamydophila pneumoniae</i> no detectada
-	+	-	+/-	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> detectada, <i>Legionella pneumophila</i> y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> no detectadas
-	+	+	+/-	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> detectadas, <i>Legionella pneumophila</i> no detectada
-	-	+	+/-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> detectada, <i>Legionella pneumophila</i> y <i>Chlamydophila pneumoniae</i> no detectadas
-	-	-	-	Test fallido
+	+	+	+	Test fallido

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct ≥40 o no señal)

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.

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.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la PCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

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.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y la especificidad clínica de Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia se evaluó utilizando muestras clínicas respiratorias.

En los estudios realizados se analizaron un total de 90 muestras respiratorias de pacientes sintomáticos. Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia se compararon con los valores obtenidos por el método de detección molecular FTD Bacterial pneumonia CAP (Fast Track Diagnostics). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Muestroteca Interna								
Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	5	85	0	0	>99	>99	>99	>99
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	4	85	0	1*	80	>99	>99	98
<i>Legionella pneumophila</i>	1	89	0	0	>99	>99	>99	>99

TP = Verdaderos positivos, TN = Verdaderos negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor predictivo positivo, NPV = Valor predictivo negativo.

*La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado.

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* (10^7 - 10^1 copias/reacción).

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia tiene un límite de detección (LoD) de ≥ 10 copias DNA/reacción para *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*.

Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Human Bocavirus humano	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-/+	Virus Influenza B/Florida/04/06	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C	-	Virus Parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Metapneumovirus humano A y B	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> (serogrupo 1, 2, 3, y 8)	-/+	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	-	Coronavirus humano 229E	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> (serogrupo 4 y 5)	-/+	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella longbeache</i>	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	Rhinovirus humano	-
<i>Legionella hackeliae</i>	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Adenovirus humano	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-/+	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus respiratorio sincitial (RSV A y RSV B)	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-				

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia para *Chlamydomphila pneumoniae* se evaluó frente a *Chlamydomphila pneumoniae*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia para *Mycoplasma pneumoniae* se evaluó frente a *Mycoplasma pneumoniae*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia para *Legionella pneumophila* se evaluó frente a *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, mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

I: 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

- 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 ha sido validado con DNA extraído de muestras respiratorias. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El ON 0318 solo interviene en la evaluación de conformidad de la prueba para *Chlamydophila pneumoniae*. El alcance de la certificación CE cubre la detección de *Chlamydophila pneumoniae* en muestras respiratorias. El resto de los patógenos tienen autocertificación para el mercado CE.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y/o *Mycoplasma pneumoniae*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla orientativa separados por tipo de tubo. Consulte la tabla y verifique el equipo y sus especificaciones antes de ejecutar el ensayo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Formatos especiales ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyler	DTprime Real-time Detection Thermal Cyler ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

(1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.

(2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(3) No lectura en canal ROX.

(4) No lectura en canal Cy5.

(5) Lectura solo en canales FAM y HEX.

(6) Se requiere compensación de color específica.

(7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.

(8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

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
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cyclor	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". El rango de muestra objetivo de fluorescencia 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	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración de los 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:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



Intended use

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia allows the qualitative detection and differentiation of human *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* by real-time PCR in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. The test is intended for use as an aid in the *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and/or *Legionella pneumophila* diagnosis in combination with clinical and epidemiological risk factors.

References

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4x8-well strip, low profile	7041049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 4x8-well strip, high profile	7042049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8x8-well strip, low profile	7081049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 8x8-well strip, high profile	7082049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, low profile	7091049
Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia 96-well plate, high profile	7092049

Reagents provided

In references 7041049, 7042049, 7081049 and 7082049:

Reference	Reagent/Material	Color	Amount
7041S049/ 7042S049	Primary Atypical Pneumonia strips low/high profile	-	4/8 x 8-well strip
7C049	Primary Atypical Pneumonia Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension 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

In references 7091049 and 7092049:

Reference	Reagent/Material	Color	Amount
7091P049/ 7092P049	Primary Atypical Pneumonia Plate low/high profile	-	1 plate
7C049	Primary Atypical Pneumonia Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension 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

Material and equipment required, not provided

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

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. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

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 *Chlamydophila 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.

Test principle

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *argR* gene for *Chlamydomphila pneumoniae*, *CARDS* gene for *Mycoplasma pneumoniae* and *mip* for *Legionella pneumophila*. After DNA isolation the targets presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease 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-use 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 detection channels of the target sequences are described below:

Target	Detection Channel
<i>Legionella pneumophila</i>	FAM
Internal Control (IC)	HEX, VIC, or JOE (depending on the equipment used)
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ROX
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cy5

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- 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 is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use.
- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- The product Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia has only been validated with the equipment mentioned in Section Compatibles real-time PCR equipment of this Instructions for Use. The rest of the compatible Real Time PCR instrument indicated in Annex 1 is based on bibliographic data.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

Specimen collection, conservation, and transport should be maintained per the conditions validated by the user. According to the literature, respiratory samples from symptomatic patients could be analyzed (i.e. sputum, bronchoalveolar lavage, bronchial aspirate, nasal swab, pharyngeal swab, nasopharyngeal swab, pharyngeal tonsillar swab, pernasal swab, nasopharyngeal aspirate and pleural fluid).

Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and be processed as soon as possible to guarantee the test quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. For long term transport (more than 48 hours), it is recommended shipping at -70°C or lower. The samples can be stored at 2°C to 8°C for up to 48 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation during a long time. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

DNA extraction

For nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).
- 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 the COBAS® AmpliPrep (ROCHE).

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 to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template, and it 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

- Prepare the number of reactions required 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 control (yellow tube) or positive control (red tube) and add them into the corresponding wells.
- 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
Initial denaturation	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 channels FAM (*Legionella pneumophila*), HEX, JOE or VIC (Internal control), ROX (*Chlamydomphila pneumoniae*) and Cy5 (*Mycoplasma pneumoniae*). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct functioning of the amplification mix check the Internal Control signal emission.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve (Ct \leq 40) in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence (Ct \geq 40 or no signal) in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control and/or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

<i>Legionella pneumophila</i> (FAM)	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (ROX)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Cy5)	Internal Control (HEX)	Interpretation
+	+	+	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> and <i>Mycoplasma pneumoniae</i> detected
-	-	-	+	<i>Legionella pneumophila</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> and <i>Mycoplasma pneumoniae</i> not detected
+	-	-	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> detected, <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> and <i>Mycoplasma pneumoniae</i> not detected
+	+	-	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> and <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> detected, and <i>M. pneumoniae</i> not detected
+	-	+	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> and <i>Mycoplasma pneumoniae</i> detected, and <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> not detected
-	+	-	+/-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> detected, <i>Legionella pneumophila</i> and <i>Mycoplasma pneumoniae</i> not detected
-	+	+	+/-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> and <i>Mycoplasma pneumoniae</i> detected, <i>Legionella pneumophila</i> not detected
-	-	+	+/-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> detected, <i>Legionella pneumophila</i> and <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> not detected
-	-	-	-	Test failed
+	+	+	+	Test failed

(+) **Positive:** Amplification signal (Ct \leq 40)

(-) **Negative:** No amplification signal (Ct \geq 40 or no signal)

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 internal control detection 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.

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

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each PCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

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.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The clinical sensitivity and specificity of Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia was evaluated using respiratory clinical samples.

In the carried-out studies, a total of 90 respiratory specimens from symptomatic patients were analysed. The results obtained with Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia were compared with the values obtained by the molecular detection method FTD Bacterial pneumonia CAP (Fast Track Diagnostics). The obtained results are shown in the following table:

Target	Internal sample library							
	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	5	85	0	0	>99	>99	>99	>99
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	4	85	0	1*	80	>99	>99	98
<i>Legionella pneumophila</i>	1	89	0	0	>99	>99	>99	>99

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

* The low amount of template DNA in this sample is below the detection limit of the method used.

These results show high agreement to detect *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* 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 *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* standards ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction.

Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia has a detection limit (LoD) of ≥ 10 DNA copies/reaction for *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*.

Analytical specificity

The analytical specificity of the *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* assay was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the species, except the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity assay					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Human Bocavirus	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-/+	Virus Influenza B/Florida/04/06	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Human Parainfluenza virus 1, 2, 3 and 4	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Human Metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> (serogroup 1, 2, 3, and 8)	-/+	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	-	Human Coronavirus 229E	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> (serogroup 4 and 5)	-/+	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella longbeache</i>	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	Human Rhinovirus	-
<i>Legionella hackeliae</i>	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Human Adenovirus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-/+	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Respiratory syncytial virus (RSV A and RSV B)	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-				

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia for *Chlamydomphila pneumoniae* was evaluated against *Chlamydomphila pneumoniae*, showing positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia for *Mycoplasma pneumoniae* was evaluated against *Mycoplasma pneumoniae*, showing positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR Primary Atypical Pneumonia for *Legionella pneumophila* was evaluated against *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 Bloomington-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, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96 [™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

I: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips, it is recommended to place a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests.
- This assay has been validated with DNA extracted from respiratory samples. The use of other samples has not been established.
- ON 0318 only intervenes in the conformity assessment of the test for *Chlamydophila pneumoniae*. The scope of the CE certification covers the detection of *Chlamydophila pneumoniae* in respiratory samples. The rest of the pathogens have self-certification for CE marking.
- The test quality depends on the sample quality; proper DNA from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Legionella pneumophila*, *Chlamydophila pneumoniae* and/or *M. pneumoniae*, either samples containing high concentrations of target 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 orientation table separated by tube type. Consult the table and verify the equipment and its specifications before running the test. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
Special Formats ⁽⁷⁾	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Bio Molecular Systems	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Mic Real Time PCR Cyler	DNA-Technology
Cepheid	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
SmartCycler®	DTprime Real-time Detection Thermal Cyler ⁽⁸⁾
Precision System Science Co., Ltd.	Eppendorf
geneLEAD VIII System	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen	Qiagen
Rotor-Gene® Q	QIAquant 96

(1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.

(2) Select Ramp Speed "Standard".

(3) No ROX caption.

(4) No Cy5 caption.

(5) Only FAM and HEX caption.

(6) Specific compensation color is required.

(7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.

(8) 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:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Color Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Color Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.













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

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Symbols for components and reagents / Símbolos para reactivos y productos

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>Producto para diagnóstico in vitro</i>		Contains sufficient for <n> test <i>Contiene <n> test</i>		Catalogue number <i>Número de referencia</i>		Keep dry <i>Almacenar en lugar seco</i>		Manufacturer <i>Fabricante</i>
	Consult instructions for use <i>Consultar las instrucciones de uso</i>		Batch code (yyyy-xxx) <i>Número de lote (yyyy-xxx)</i>		Use by (yyyy-mm-dd: year-month-day) <i>Fecha de caducidad (yyyy-mm-dd: año-mes-día)</i>		Temperature limitation <i>Limitación de temperatura</i>		Volume <i>Volumen</i>
	Unique Device Identifier (UDI) <i>Código de Identificación única (UDI)</i>		CE marking <i>Marcado CE</i>						

Change Control / Control de cambios		
Version Nº / Versión Nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original version	17/02/2022

Real-Time PCR Kits



VA Vitassay

identifying pathogens worldwide

Vitassay Healthcare, S.L.U

Parque Tecnológico Walqa

Ctra. N-330 Km. 566

22197 Huesca (Spain)

Ph. (+34) 974 001 193

info@vitassay.com

www.vitassay.com

F09-81 Rev.00