

LEGIONELLA PNEUMOPHILA DNA



PCR cualitativa en tiempo real para detección del genoma de Legionella pneumophila

4BShopLab

ADN de *Legionella pneumophila*

A. OBJETIVO DEL EQUIPO

El equipo de PCR en tiempo real **cuantitativa de ADN de *Legionella pneumophila*** (código LEPDNA.CE) ha sido desarrollado para la detección cualitativa de ADN de *Legionella pneumophila* en muestras biológicas con un control simultáneo de la reacción de amplificación a través de un **Control interno (IC)**.

El equipo se ha adaptado para el uso en termocicladores Real-Time y ABI 7500 Sequence Detection System® (software SDS, versión 1.3.1, Applied Biosystems™*) o MX3000P (software MxPro, versión 4.01, Stratagene™***).

* Applied Biosystems es una marca comercial registrada y ABI PRISM® es una marca comercial de Applied Corporation o sus filiales en EE.UU. y/o en otros países determinados.

***Stratagene es una marca comercial registrada.

B. INTRODUCCIÓN

La *Legionella pneumophila*, un bacilo Gram negativo móvil que no forma esporas, es el agente etiológico de la legionelosis. Los síntomas clínicos pueden variar en gravedad, desde una enfermedad febril leve (fiebre de Pontiac) hasta una neumonía rápida y potencialmente mortal (enfermedad del legionario). La *L. pneumophila* es una causa común de neumonía nosocomial y adquirida en los viajes y, con las especies de bacterias *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, es una de las tres causas principales de neumonía esporádica, adquirida en la comunidad. La primera cepa de legionela se aisló en 1943 y se clasificó como organismo similar a una rickettsia, y el género se estableció en 1979, tras un gran brote de neumonía entre los miembros de la Legión americana que tuvo lugar tres años antes. Después de esto, se clasificó un amplio rango de especies de legionela. El género incluye 50 especies y se han clasificado 16 serogrupos de *L. pneumophila*. Las legionelas se encuentran en entornos hídricos naturales y artificiales de todo el mundo, y sobreviven en numerosas condiciones ambientales. El diagnóstico de laboratorio de *L. pneumophila* en muestras biológicas suele basarse en cultivos, técnicas serológicas, de tinción directa de anticuerpos fluorescentes (DFA), o pruebas de detección de orina. El aislamiento de las especies de legionela, que tiene una especificidad del 100%, se considera el estándar de oro para confirmar la presencia de bacterias, tanto para muestras biológicas como ambientales. El diagnóstico mediante cultivo requiere un medio especial y se necesitan varios días para obtener un resultado positivo.

Los ensayos moleculares, como los ensayos PCR en tiempo real, han demostrado ser una herramienta útil para la detección de *L. pneumophila* gracias a su alta sensibilidad, especificidad, facilidad de uso y a su método rápido.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El equipo LEPDNA.CE se basa en una química en tiempo real que utiliza cebadores y sondas específicas.

El ADN de *Legionella pneumophila*, recuperado de una muestra biológica en investigación en una fase de extracción, se amplifica utilizando un sistema de amplificación en tiempo real. El producto amplificado se detecta usando una sonda con tinte indicador fluorescente específica para una *Legionella pneumophila*.

El Control interno (IC) heterólogo sirve como control de extracción/amplificación para cada muestra procesada individualmente con el fin de identificar inhibidores de la reacción.

Un control positivo alto (CTRL-H) y un control positivo bajo (CTRL-L) se suministran como controles de la reacción PCR.

D. COMPONENTES

El formato estándar del producto, código LEPDNA.CE, contiene reactivos suficientes para realizar 50 pruebas.

Componente	Etiquetado y contenido	DRNA.CE 50 reacciones
A CÓDIGO: ALL/MM CÓDIGO COLOR: AZUL CLARO	Mezcla maestra	Viales n.º 2 / 0,4 ml
B CÓDIGO: LEP/CB CÓDIGO COLOR: AMARILLO	Cebadores/sondas liofilizados	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
C CÓDIGO: ALL/C CÓDIGO COLOR: GRIS	Agua grado molecular	Viales n.º 2 / 1,5 ml
NTC CÓDIGO: ALL/NTC CÓDIGO COLOR: BLANCO	Control negativo	Viales n.º 1 / 1,5 ml
CTRL-H Control positivo alto (1,32x10 ⁴ copias/µl) CÓDIGO: LEP/CTRL-H CÓDIGO COLOR: VIOLETA	Positivo alto cualitativo liofilizado	Viales n.º 8 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
CTRL-L Control positivo bajo (1,32x10 copias/µl) CÓDIGO: LEP/CTRL-L CÓDIGO COLOR: ROSA	Positivo bajo cualitativo liofilizado	Viales n.º 8 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
IC Control interno CÓDIGO: ALL/IC CÓDIGO COLOR: VERDE	Control interno liofilizado	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
Manual de instrucciones	Instrucciones de uso	1

Nota importante: Dia.Pro puede suministrar bajo pedido reactivos para 25, 100, 150 reacciones, como se indica en la tabla:

1. Componente A	Vial n.º 1 / 0,4 ml	Viales n.º 4 / 0,4 ml	Viales n.º 6 / 0,4 ml
2. Componente B	Vial n.º 1	Viales n.º 4	Viales n.º 6
3. Componente C	Vial n.º 1 / 1,5 ml	Viales n.º 2 / 1,5 ml	Viales n.º 3 / 1,5 ml
4. NTC	Vial n.º 1 / 1,5 ml	Viales n.º 1 / 1,5 ml	Viales n.º 1 / 1,5 ml
5. IC	Vial n.º 1	Viales n.º 4	Viales n.º 6
6. CTRL-H	Vial n.º 4	Viales n.º 4	Viales n.º 6
7. CTRL-L	Vial n.º 4	Vial n.º 4	Vial n.º 6
8. Manual instrucc.	n.º 1	n.º 1	n.º 1
Número de pruebas	25	100	150
Código	LEPDNA.CE.25	LEPDNA.CE.100	LEPDNA.CE.150

E. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El equipo LEPDNA.CE debe almacenarse a +2...8 °C. Una vez disueltos, el **Componente B** (código LEP/CB) y el **Componente IC** (código ALL/IC) se mantienen estables durante 4 meses a -20 °C. Una vez disueltos, los **Componentes de control positivo ALTO y BAJO** (código LEP/CTRL-HIGH, LEP/CTRL-LOW) se mantienen estables durante 2 semanas a -20 °C. Si los componentes se van a utilizar solo de forma intermitente, deberían congelarse en alícuotas. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos. Solo se permite descongelar una vez.

F. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (0,5 µl < volumen < 1000 µl)
2. Equipo de extracción de ADN
3. MG EtOH
4. Bloque térmico
5. Microcentrífuga
6. Racks para tubos
7. Punta filtrada estéril con barrera contra aerosoles
8. Microtubos libres de nucleasa
9. Microtubos de 0,2 ml o microplacas PCR recomendados por los fabricantes de los instrumentos PCR en tiempo real
10. Guantes desechables, sin polvo
11. Termociclador Real-Time PCR (*)
12. Papel absorbente
13. Vórtex o similar.

(*) **Atención:** Se debe realizar de forma rutinaria una calibración válida de los tintes puros (archivo del componente del espectro puro) y del fondo (archivo del componente de fondo).

G. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo solo debe usarse por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe tener una amplia formación en el uso de termocicladores Real-Time, en la manipulación de reactivos para biología molecular y en los protocolos de amplificación de PCR en tiempo real.
3. El equipo debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en este campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada del laboratorio, guantes sin polvo y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*", ed. 1984.
5. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
6. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire.

7. Los componentes A y B son sensibles a la luz. Protegerlos de la exposición a la luz intensa.

8. Evitar vibraciones de la superficie de la mesa de trabajo donde se realiza la prueba.

9. Tras la recepción, conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.

10. No intercambiar componentes de lotes distintos, ni tampoco de equipos distintos del mismo lote.

11. Comprobar que los reactivos estén claros y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.

12. Evitar contaminación cruzada entre muestras usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.

13. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.

14. No usar el equipo después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase externo.

15. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todos los lavados broncoalveolares humanos deben ser manipulados al nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y según ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*", ed. 1984.

16. Almacenar y extraer las muestras separadas de los demás reactivos y usar un espacio separado para su manipulación.

17. Disolver los reactivos liofilizados con la cantidad correcta, indicada en las etiquetas, de componente C (código: ALL/C) suministrado con el equipo.

18. Llevar a cabo todas las operaciones lo más rápido posible, manteniendo los componentes en hielo o en un bloque de refrigeración.

19. El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, comenzando en la zona de extracción y avanzando hasta la zona de amplificación y de análisis de datos. No devolver las muestras, equipos o reactivos a la zona donde se hayan realizado las fases anteriores.

20. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos o para la transferencia de los componentes a los equipos automatizados, a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

21. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. Especialmente, los desechos líquidos procedentes de los procedimientos de extracción de muestras deben tratarse como material potencialmente infeccioso y deben inactivarse antes de su eliminación. No poner los desechos de la extracción en contacto con lejía.

22. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

23. Otros materiales de desecho generados (por ejemplo, puntas usadas para las muestras) deben ser manipulados como potencialmente infecciosos y deben eliminarse de acuerdo con las directivas y leyes nacionales sobre los residuos de laboratorio.

H. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. El lavado broncoalveolar (LBA) debe obtenerse en tubos de polipropileno sin adición de conservantes.

2. Las muestras deben transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 a +8 °C durante un período máximo de 3 días.

3. No congelar las muestras de lavado broncoalveolar para evitar lisis celular y pérdida de título del ADN bacteriano.

4. La hemoglobina y las mucoproteínas en el ADN extraído de las muestras de LBA podrían inhibir la reacción de amplificación.

5. Las muestras de lavado broncoalveolar deben pretratarse antes de la extracción de ADN según el apartado M.

6. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres, para evitar errores en los resultados.

I. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Mezcla maestra:

Componente A. Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar y centrifugar brevemente para recoger el volumen completo.

ADVERTENCIA: El componente A es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Cebadores/Sondas:

Componente B.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente B liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener la disolución en la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente ($15\text{ }^{\circ}\text{C} < \text{RT} < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Mezclar brevemente con un vórtex

ADVERTENCIA: El componente B es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Agua grado molecular:

Componente C. Listo para el uso.

Control negativo:

NTC. Listo para el uso.

Controles positivos:

Componente CTRL-H.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el CTRL-H liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener la disolución en la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente ($15\text{ }^{\circ}\text{C} < \text{RT} < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Mezclar brevemente con un vórtex

Componente CTRL-L.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el CTRL-L liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener en la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente ($15\text{ }^{\circ}\text{C} < \text{RT} < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Mezclar brevemente con un vórtex

Control interno:

IC

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.

- Disolver de forma homogénea el IC liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.

- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente ($15\text{ }^{\circ}\text{C} < \text{RT} < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

- Mezclar brevemente con un vórtex

L. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

1. Las **micropipetas** deben calibrarse y deben someterse a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 5%.
2. **Dispositivo de extracción.** El equipo LEPDNA.CE ha sido diseñado para usarse solo con QIAamp DNA Minikit, código 51306 (QIAGEN), y Nucleospin Tissue kit, código: 740952 (Macherey-Nagel). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por los fabricantes.
3. **Termocicladores Real-Time y software de los instrumentos.** El equipo LEPDNA.CE ha sido diseñado para usarse solo con los termocicladores Real Time ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso de los instrumentos suministradas por los fabricantes.

M. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados observables a simple vista. Comprobar que en la parte inferior de los viales de los componentes liofilizados haya un agregado bien formado. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.
3. Disolver los componentes liofilizados con la cantidad adecuada de componente C (agua grado molecular) como se describe en el apartado correspondiente (I).
4. Encender los termocicladores, comprobar la configuración y asegurarse de que se usa el protocolo de ensayo correcto.
5. Seguir estrictamente los manuales de los instrumentos suministrados por los fabricantes para la configuración correcta de los termocicladores Real-Time.
6. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
7. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
8. En caso de surgir algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

N. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con lo indicado a continuación.

N.1 Pretratamiento de la muestra

- Transferir un máximo de 1 ml de muestra a un tubo estéril.
- Añadir 50 microlitros por ml de solución mucolítica de N-acetilcisteína (concentración: 100 mg/ml).
- Mezclar bien con un vórtex durante 15 segundos.
- Incubar a +2 / +8 °C durante 10 minutos.
- Agitar bien la muestra hasta que esté completamente líquida.
- Centrifugar a 2500 r.p.m. durante 15 minutos.
- Desechar los sobrenadantes.

- Proceder con la extracción de ADN.

N.2 Extracción de ADN

La fase de extracción del ADN genómico de *Legionella pneumophila* debe realizarse exclusivamente en combinación con los siguientes equipos:

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
Lavado broncoalveolar	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™
Lavado broncoalveolar	NucleoSpin Tissue Kit	740952	MN™

El usuario final deberá realizar la extracción de ADN genómico de *Legionella pneumophila* de la muestra de lavado broncoalveolar, siguiendo las instrucciones del fabricante, con los siguientes equipos:

• QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

Notas importantes: El protocolo “DNA Purification from Tissue” (Purificación de ADN del tejido) que se describe en las instrucciones del fabricante debe aplicarse con las siguientes modificaciones:

1. Iniciar el protocolo en el paso n.º 2a usando como muestra el precipitado obtenido como se describe en el apartado N.1 (Pretratamiento de la muestra) en lugar de la muestra de tejido.
2. En el paso n.º 11, usar 100 µl de tampón de elución en lugar de 200 µl.

• NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)

Nota importante: Seguir el protocolo 5, “Standard protocol for human or animal tissues and cultured cells” (Protocolo estándar para tejidos humanos o animales y células cultivadas), que se describe en las instrucciones del fabricante, aplicando las siguientes modificaciones:

1. Iniciar el protocolo en el paso n.º 1, apartado **Células cultivadas “Prelisis”**, usando el precipitado obtenido como se describe en el apartado N.1 (Pretratamiento de la muestra).

El ADN obtenido de las muestras, no usado en la serie, debe almacenarse adecuadamente congelado (de -20 a -80 °C).

Nota importante: El IC del equipo LEPDNA.CE puede usarse en el procedimiento de aislamiento como control de extracción.

El valor Ct del control interno para las muestras negativas se usa para evaluar si el procedimiento de extracción de ADN se ha realizado correctamente (véase el apartado Q).

Para esta aplicación, añadir 5 µl de IC a la mezcla de tampón de lisis y muestra, y proceder siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante del equipo de extracción.

N.3 Configuración de la reacción

El equipo **LEPDNA.CE** ha sido diseñado para usarse solo con ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene).

N.3.1 Preparación de PCR

Importante: En el apartado O se incluye un ejemplo de esquema de dispensación. Consúltelo antes de leer las instrucciones siguientes.

- Preparar los componentes como se describe en el apartado I.
- Preparar el número requerido de tubos de reacción o una placa de reacción de 96 pocillos para las muestras en evaluación y para los controles positivos (preparados como se describe en el apartado I).

Nota importante: Usar solo tubos ópticos o microplacas sugeridos por los fabricantes de los termocicladores Real-Time.

- Tener en cuenta que las muestras deberían comprobarse por duplicado, siempre que sea posible.
- Incluir al menos 1 tubo/pocillo para el NTC (control negativo).
- Preparar la **mezcla de amplificación** para **muestras, NTC y controles positivos (CTRL-H, CTRL-L)** según la siguiente tabla:

Preparación de la mezcla de amplificación **(IC como control de amplificación)**

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	12,5 µl	150 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	24 µl
IC	Control interno	0,5 µl	6 µl
Vol. total		15 µl	180 µl

Nota importante: Si el control interno se añadió durante el procedimiento de aislamiento del ADN, preparar la **mezcla de amplificación** para **muestra, NTC y controles positivos (CTRL-H, CTRL-L)** como se describe en la siguiente tabla:

Preparación de la mezcla de amplificación **(IC como control de extracción/amplificación)**

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	12,5 µl	150 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	24 µl
C	Agua grado molecular	0,5 µl	6 µl
Vol. total		15 µl	180 µl

N.3.2 Procedimiento de amplificación

- Dispensar 15 µl de la mezcla de amplificación en cada tubo de reacción o pocillo de la microplaca.
- Añadir 10 µl de las **muestras, NTC, CTRL-H y CTRL-L** a los tubos de reacción.
- Cerrar bien los tubos de reacción.

- Centrifugar brevemente los tubos de reacción a 2000 r.p.m.
- No dejar los tubos de reacción a temperatura ambiente (RT) durante más de 30 minutos ni exponer a la luz (cubrir los tubos).
- Cargar los tubos de reacción en el soporte del bloque térmico del termociclador Real-Time.
- Tras las operaciones de configuración descritas en el apartado N.4 (Programación del instrumento), iniciar la serie del termociclador.

Nota importante: Los componentes liofilizados tras la disolución en componente C (agua grado molecular) no estarán estables más de 3 horas. Mantener en hielo o a una temperatura de 2 a 8 °C.

El volumen no utilizado de Componente B, CTRL-H, CTRL-L y de IC puede congelarse a -20 °C y usarse como se indica en el apartado E.

N.4 Programación del instrumento

Para la programación del instrumento, consultar el manual de instrucciones del instrumento proporcionado por los fabricantes.

Nota importante: Para Mx3000P ajustar "Ajuste de ganancia del filtro": ROX = x1, FAM = x8, HEX/JOE = x1. (véase el manual de instrucciones del software MxPro™ QPCR, pág. 41).

N.4.1 Perfil térmico

El perfil térmico se indica en la siguiente tabla:

Fase	Ciclo	Temp.	Tiempo
1	1	50 °C	2 min
1	1	95 °C	10 min
2	50	95 °C	15 s
		60 °C (*)	1 min

NOTA IMPORTANTE: (*) fase para la adquisición de datos en tiempo real.

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con el perfil térmico correcto siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

N.4.2 Selección de los detectores

Siguiendo los manuales de instrucciones de los termocicladores Real-Time sugeridos (ABI 7500, MX3000P Stratagene), seleccionar los detectores indicados en la siguiente tabla:

Detección	Indicador	Templador
<i>Legionella pneumophila</i>	FAM	No fluorescente
Control interno (IC)	JOE	No fluorescente
Referencia pasiva	ROX	No presente

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con la configuración correcta siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

O. ESQUEMA DEL ENSAYO

A continuación, se describe un ejemplo del esquema de dispensado para análisis cualitativo:

Microplaca o tubos					
	1	2	3		
A	CTRL-H 1,32x10 ⁴ copias/μl	Muestra 6			
B	CTRL-L 1,32x10 ⁴ copias/μl	Muestra 7			
C	NTC	Muestra 8			
D	Muestra 1	Muestra 9			
E	Muestra 2	Muestra 10			
F	Muestra 3	Muestra 11			
G	Muestra 4	Muestra 12			
H	Muestra 5	Muestra 13			

Leyenda: NTC = Control negativo CTRL-H, CTRL-L = Controles positivos ADN *Legionella pneumophila*, Muestra 1,2,3 = Muestras en evaluación.

P. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

P.1 Configuración pre-análisis

Antes de iniciar el análisis:

- Ajustar la "línea de base" (nivel fluorescente del fondo) como se indica a continuación:

"Línea de base"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Manual: 3-15
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptable (No usar algoritmo Mx4000 v1.00 a v3.00)

- Ajustar manualmente el "umbral" fluorescente FAM/JOE.

"Umbral" fluorescente FAM	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0,075
STRATAGENE™ MX3000P®	0,075

"Umbral" fluorescente JOE	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0,075
STRATAGENE™ MX3000P®	0,02

P.2 Análisis de datos

Se realiza una comprobación en los controles positivos alto y bajo cada vez que se usa el equipo para verificar si sus valores Ct son los esperados e indicados en la siguiente tabla:

Comprobar FAM	Requisitos
CTRL-H	$19 \leq Ct$ (ciclo umbral) $< 23,5$
CTRL-L	$29 \leq Ct$ (ciclo umbral) $< 33,5$

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para cada muestra, se asume la fluorescencia FAM (valor Ct positivo/negativo) y la fluorescencia interna para validar la detección de ADN LEP, como se describe en la siguiente tabla:

FAM <i>L. Pneumophila</i>	JOE del control interno	Resultado del ensayo
MUESTRA POSITIVA	+	CORRECTO
	-	CORRECTO*
MUESTRA NEGATIVA	Ct < 40	CORRECTO
	Ct > 40 o indeterminada	NO VÁLIDO**

*Una concentración inicial alta de ADN de *L. pneumophila* en la muestra (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.

**Pueden aparecer problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficiente o ausente) o durante la fase de extracción (presencia de inhibidores o muestra inicial con número insuficiente de células) que podrían dar lugar a resultados incorrectos. El procedimiento de prueba debe repetirse empezando desde la fase de extracción, utilizando una muestra fresca procedente del paciente.

Los resultados obtenidos con este producto deben ser interpretados teniendo en cuenta los síntomas clínicos y los demás parámetros del laboratorio relacionados con las condiciones del paciente.

Son posibles los siguientes resultados:

	FAM	IC	Resultado	COMPROBAR
MUESTRA desconocida	+	+	RESULTADO CORRECTO <u>Positivo</u>	
MUESTRA desconocida	-	Ct>40 o indet.	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento o mal funcionamiento de los instrumentos	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo; 7. que el procedimiento de extracción se haya realizado correctamente.

MUESTRA desconocida	-	+	RESULTADO CORRECTO <u>Negativo</u>	
CTRL-H/CTRL-L	+	+	RESULTADO CORRECTO	
CTRL-H/CTRL-L	-	Ct>40 o indet.	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo
CTRL-H/CTRL-L	-	+	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 4. que el equipo se haya almacenado correctamente
NTC	-	+	RESULTADO CORRECTO	
NTC	+	+	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que el lugar de trabajo y los instrumentos se descontaminen a intervalos regulares; 4. que el equipo se haya almacenado correctamente
NTC	+	Ct>40 o indet.	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que el lugar de trabajo y los instrumentos se descontaminen a intervalos regulares; 4. que el equipo se haya almacenado correctamente

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.

Si aparecen uno o más de los problemas descritos en la tabla anterior, tras la comprobación, informar al supervisor de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

R. RENDIMIENTO

La evaluación de los rendimientos se ha realizado de acuerdo con lo indicado en las Especificaciones técnicas internas (ITS). La evaluación del rendimiento se llevó a cabo en laboratorios DiaPro con materiales suministrados por el laboratorio clínico de referencia.

R.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica se puede expresar para métodos cualitativos como **límite de detección**.

Límite de detección (LOD): es la cantidad mínima de sustancia que puede detectarse por un sistema de comprobación con una probabilidad establecida.

Para las pruebas NAT, se expresa como la concentración mínima del **analito** que, tras probarse en múltiples repeticiones, da un resultado positivo.

El **límite de detección (LOD)** se determina probando diluciones en serie que contienen concentraciones conocidas del analito.

El **LOD** es la concentración mínima de analito que puede detectarse de forma consistente (p. ej., en $\geq 95\%$ de las muestras en condiciones rutinarias del laboratorio).

Para el equipo LEPDNA.CE, el **LOD** se ha determinado mediante el análisis de 24 réplicas (8 réplicas en tres series distintas) de la dilución máxima del analito que puede detectarse en el 100% de estas.

Los resultados son los siguientes:

Límite de detección (LOD) ($p=0,05$)	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	1 copia / μ l
STRATAGENE™ MX3000P®	1 copia / μ l

Esto significa que siempre se detecta una concentración de $1E+00$ copias / μ l con el instrumento indicado anteriormente.

R.2 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica es la capacidad de un método de detectar solo la secuencia de ADN meta.

La especificidad analítica del ensayo de LEPDNA se ha estudiado del siguiente modo:

1. El juego de cebador/sonda se ha elegido analizando la secuencia meta del genoma con un software adecuado (LionSoft v.1.0 suministrado por Biotools y Primer Express v.3.0 suministrado por Applied Biosystems Inc.).
2. El juego de cebador/sonda y la secuencia meta del genoma han sido controlados por el software "BLAST", para comprobar si alguna de las secuencias nucleótidas depositadas en los bancos genómicos a nivel mundial tiene alguna homología con la *Legionella pneumophila*, y por el software "ClustalX", para comparar las secuencias meta del genoma de los distintos genotipos de *L. pneumophila*.
3. La especificidad se mejoró mediante la selección de condiciones de reacción estrictas.
4. Las muestras procedentes de pacientes con infecciones debidas a organismos que interfieren potencialmente se obtuvieron de un centro clínico de referencia.

Los resultados se indican en la tabla siguiente:

Organismo	Resultado
<i>Mycobacterium sp</i>	negativo
<i>Neisseria meningitidis</i>	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo
<i>Legionella longbeachae</i>	negativo
<i>Legionella Micdadei</i>	negativo

R.3 ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA

R.3.1 Especificidad diagnóstica

La especificidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado negativo en ausencia del marcador meta. Así, la muestra **negativa verdadera** es una muestra

conocida como negativa para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

Este parámetro se estudió examinando 10 lavados broncoalveolares negativos de ADN de *L. pneumophila*.

NEGATIVOS VERDADEROS	10
FALSOS POSITIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	10
ESPECIFICIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la **especificidad diagnóstica del sistema se ha calculado $\geq 99\%$** .

R.3.2 Sensibilidad diagnóstica

La **sensibilidad diagnóstica** es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en presencia del marcador meta. Así, la muestra **positiva verdadera** es una muestra conocida como positiva para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

En el equipo con código LEPDNA.CE, este parámetro se estudió examinando lavados broncoalveolares positivos de ADN de *L. pneumophila*. Las muestras se estudiaron en duplicados en la misma serie y, a continuación, se calculó el porcentaje (%) de muestras positivas.

POSITIVOS VERDADEROS	10
FALSOS NEGATIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	10
SENSIBILIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la **sensibilidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%**.

Sensibilidad diagnóstica	100 %
Especificidad diagnóstica	> 99,5 %

R.4 PRECISIÓN

La precisión muestra el grado de fiabilidad del sistema. Cada procedimiento de medición tiene una variación aleatoria inherente denominada "error aleatorio". El error aleatorio no tiene un valor numérico, sino que se determina por dispersión de la medición como desviación estándar (DevST) y variación de coeficiente (CV%). Normalmente, la precisión de un ensayo se refiere a la concordancia entre mediciones repetidas del mismo material.

En el equipo con código LEPDNA.CE, la **precisión** se expresó como variabilidad intraensayo y variabilidad interensayo. Se probaron 8 réplicas del CTRL-H y CTRL-L en la misma serie (intraensayo) y en tres series distintas (interensayo).

Tomando como base los resultados obtenidos, se calculó la variabilidad intraensayo e interensayo.

En ausencia de parámetros establecidos en las ETC de la Directiva IVD europea, hemos identificado el siguiente valor de aceptabilidad para el ADN de *L. pneumophila*:

Variación de coeficiente de intraensayo (CV%) $\leq 10\%$.

Variación de coeficiente de interensayo (CV%) $\leq 10\%$.

S. LIMITACIONES

Antes de la utilización del equipo se aconseja leer cuidadosamente y entender las instrucciones. El seguimiento estricto del protocolo es fundamental para obtener unos resultados fiables. Especialmente, el pipeteado preciso de muestra y reactivo, la aplicación de un flujo de trabajo correcto, junto con una programación cuidadosa de la fase de termociclado, son esenciales para la detección precisa y reproducible de ADN de *L. pneumophila*.

Se recomienda que la confidencialidad, el asesoramiento y la evaluación médica apropiados, se consideren un aspecto esencial de la secuencia de prueba.

T. BIBLIOGRAFÍA.

1. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. S. Fields, R.F. Benson, R. E. Besser. Clin Microbiol. Rev. July 2002; 15 (3):506–526. Review.
2. Legionnaires' disease. Edelstein, P. H. 1993. Clin. Infect. Dis.16:741–749.
3. Koide, M., and A. Saito. 1995. Diagnosis of *Legionella pneumophila* infection by polymerase chain reaction. Clin. Infect. Dis. 21:199–201.
4. Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis. Maurin M, Hammer L, Gestin B, Timsit JF, Rogeaux O, Delavena F, Tous J, Epaulard O, Brion JP, Croizé J.
5. Clin Microbiol Infect. 2010 Apr;16(4):379-84 Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, Ieven M. J Microbiol Methods. 2008 Jun;73(3):257-62.

U. Símbolos

LEYENDA			
	Código del producto		Temperatura de almacenamiento
	Dispositivo de diagnóstico in vitro		Ver instrucciones de uso
	N.º de lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
	Marca de conformidad CE		Fecha de fabricación

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

4BShopLab



consip

acquistinretepa

DISTRIBUIDOR

4BShop Lab Srls



info@4BShopLab.com



www.4BShopLab.com



+39.0371.18.56.643

FABRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl



MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified



FIND 
Because diagnosis matters