



LEGIONELLA PNEUMOPHILA DNA

Real-Time PCR qualitativa per la determinazione di Legionella Pneumophila



4BShopLab

DNA di Legionella pneumophila

A. USO PREVISTO

Il kit Real Time PCR **Legionella Pneumophila Qualitative**, identificato con il codice **LEPDNA.CE**, è destinato alla determinazione qualitativa in campioni biologici del DNA di Legionella Pneumophila con controllo simultaneo della reazione di amplificazione, mediante un **Controllo Interno (I.C.)**.

L'utilizzo del kit è compatibile con strumenti real-time ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS versione 1.3.1, Applied Biosystems™*) oppure MX3000P (Software MxPro versione 4.01, Stratagene™***).

* Applied Biosystems è un marchio registrato e ABI PRISM® è un marchio di proprietà di Applied Biosystems Corporation o sue consociate negli USA e/o altri paesi.
***Stratagene è un marchio registrato.

B. INTRODUZIONE

La Legionella pneumophila, un batterio mobile gram-negativo, asporigeno, è l'agente eziologico della legionellosi. I sintomi clinici possono variare da un quadro patologico con febbre di gravità lieve (febbre di Pontiac) ad una polmonite ad evoluzione rapida, potenzialmente letale (malattia del legionario). La L. pneumophila è causa comune di polmoniti nosocomiali e di polmoniti acquisite in viaggio oltre ad essere una delle tre principali cause di polmonite sporadica acquisita in comunità, insieme alle specie batteriche Mycoplasma pneumoniae e Chlamydia pneumoniae. I primi ceppi di legionella sono stati isolati nel 1943 e classificati come organismi simili a rickettsie, mentre il genere è stato definito nel 1979, dopo una vasta epidemia di polmonite che aveva colpito 3 anni prima un gruppo di veterani della legione Americana. Successivamente a questo evento, è stato classificato un ampio spettro di specie di legionella, al momento il genere comprende 50 specie e 16 sierogruppi distinti di L. pneumophila. Le Legionelle sono ampiamente diffuse in tutto il mondo in ambienti acquatici naturali e artificiali e sopravvivono in una vasta gamma di condizioni ambientali.

La diagnosi di laboratorio della L. pneumophila in campioni biologici si basa solitamente su tecniche di individuazione mediante prove di fluorescenza diretta (DFA) sierologiche colturali o test delle urine. L'isolamento della specie di Legionella, che raggiunge una specificità del 100%, è considerato il gold standard in grado di confermare la presenza del batterio sia in campioni biologici che ambientali. La diagnosi colturale richiede un mezzo speciale e vari giorni per ottenere un risultato positivo.

Indagini molecolari come i test real-time PCR si sono rivelati uno strumento utile per la determinazione della L. pneumophila, grazie a sensibilità elevata, specificità, facilità d'uso e rapidità del metodo.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit LEPDNA.CE si basa su una chimica real-time che utilizza primer e probe specifici.

Il **DNA di Legionella pneumophila**, recuperato dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene amplificato utilizzando il sistema di amplificazione real-time. Il prodotto amplificato viene determinato mediante probe con reporter a colorante fluorescente specifico per **Legionella pneumophila**.

Il controllo interno (IC) eterologo funge da controllo dell'estrazione/dell'amplificazione per ogni campione trattato singolarmente, con l'obiettivo di identificare eventuali inibitori della reazione.

Come controlli della reazione di PCR sono forniti un controllo positivo alto (CTRL-H) e un controllo positivo basso (CTRL-L).

D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato come LEPDNA.CE contiene reagenti per 50 test.

Componente	Etichettatura e contenuto	DRNA.CE 50 reazioni
A CODIFICATO: ALL/MM CODICE COLORE: AZZURRO	Master mix	N°2 vials / 0.4 ml
B CODIFICATO: LEP/CB CODICE COLORE: GIALLO	Primer/probe liofilizzati	N°2 vials (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
C CODIFICATO: ALL/C CODICE COLORE: GRIGIO	Acqua MG	N°2 vials /1.5 ml
NTC CODIFICATO: ALL/NTC CODICE COLORE: BIANCO	Controllo negativo	N°1 vials /1.5 ml
CTRL-H Controllo positivo alto (1,32x10 ⁴ copie/µl) CODIFICATO:LEP/CTRL-H CODICE COLORE: VIOLA	Controllo positivo basso liofilizzato qualitativo	N° 8 vials (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
CTRL-L Controllo positivo basso (1,32x10 copie/ul) CODIFICATO:LEP/CTRL-L CODICE COLORE: ROSA	Controllo positivo basso liofilizzato qualitativo	N° 8 vials (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
I.C. Controllo interno CODIFICATO: ALL/IC CODICE COLORE: VERDE	Controllo interno liofilizzato	N°2 vials (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
Foglietto illustrativo	Istruzioni per l'uso	1

Nota importante: su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100, 150 test, come riportato nella tabella sottostante

1. Componente A	n°1 vial/0.4 ml	n°4 vial/0.4 ml	n°6 vial/0.4 ml
2. Componente B	n°1 vial	n°4 vial	n°6 vial
3. Componente C	n°1 vial/1.5 ml	n°2 vial/1.5 ml	n°3 vial/1.5 ml
4. NTC	n°1 vial/1.5 ml	n°1 vial/1.5 ml	n°1 vial/1.5 ml
5. IC	n°1 vial	n°4 vial	n°6 vial
6. CTRL-H	n°4 vial	n°4 vial	n°6 vial
7. CTRL-L	n°4 vial	n°4 vial	n°6 vial
8. Foglietto illustrativo	n°1	n°1	n°1
Numero di test	25	100	150
Codice	LEPDNA.CE.25	LEPDNA.CE.100	LEPDNA.CE.150

E. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Il kit codificato LEPDNA.CE deve essere conservato a +2...+8 °C.

Una volta risospeso il **Componente B** (codice LEP/CB) e il **Componente IC** (codice ALL/IC) sono stabili 4 mesi a -20°C. Una volta risospesi i **Componenti controllo positivo alto e basso** (codici LEP/CTRL-H e LEP/CTRL-L) sono stabili 2 settimane a -20°C. Se i componenti risospesi devono essere usati più volte si raccomanda di preparare aliquote, ripetuti congelamenti e scongelamenti devono essere evitati. Solo uno scongelamento è ammesso.

F. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (0,5 µl < volume <1000 µl)
2. Kit di estrazione del DNA
3. MG EtOH
4. Blocco termico
5. Microcentrifuga
6. Portaprovette
7. Puntale sterile con filtro con barriera aerosol
8. Microprovette prive di nucleasi
9. Microprovette da 0,2 ml o micropiastre per PCR raccomandate dai produttori di strumenti per PCR real-time
10. Guanti monouso non talcati
11. Termociclatore per PCR real-time (*)
12. Fazzoletti di carta assorbente
13. Vortex o miscelatori similari

(*) **Attenzione:** deve essere effettuata regolarmente una calibrazione valida di pure dyes (Pure Spectra Component File) e background (Background Component File).

G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico esperto ed adeguatamente addestrato, dietro supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere specificamente addestrato all'uso dei termociclatori real-time, nonché alla manipolazione dei reagenti per biologica molecolare e deve avere familiarità con i protocolli di amplificazione per PCR real-time.
3. Per effettuare questo tipo di analisi, il kit deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale di settore (Ministero della Salute o ente similare).
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti non talcati ed occhiali. Evitare di utilizzare oggetti appuntiti (aghi) e taglienti (lame). Tutto il personale interessato deve essere addestrato alle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA, e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale impiegato nel trattamento dei campioni deve essere vaccinato contro HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.

6. L'ambiente di laboratorio deve essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici a trasmissione per via aerea.

7. I componenti A e B sono fotosensibili. Occorre quindi proteggerli dall'esposizione a luce intensa.

8. Evitare vibrazioni sulla superficie del banco dove viene eseguita l'analisi.

9. Al ricevimento, riporre il kit in un frigorifero a temperatura controllata o in una camera fredda a una temperatura di +2/+8°C.

10. Non mischiare i componenti dei kit di diversi lotti. Si raccomanda anche che non vengano scambiati componenti tra due kit dello stesso lotto.

11. Assicurarsi che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. In caso contrario, informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie alla sostituzione del kit.

12. Evitare la contaminazione crociata tra campioni, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione.

13. Evitare la contaminazione crociata tra reagenti del kit, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni uso.

14. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta del confezionamento esterno.

15. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i lavaggi broncoalveolari dovrebbero essere trattati al livello 2 delle norme di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e nel rispetto delle norme riportate nella pubblicazione degli Institutes of Health's: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

16. Conservare ed estrarre i campioni separatamente da altri reagenti e usare una stanza separata per la loro manipolazione.

17. Dissolvere i reagenti liofilizzati con la quantità corretta, riportata sull'etichetta, del componente C (codificato: ALL/C) in dotazione nel kit.

18. Effettuare tutte le necessarie operazioni nel minor tempo possibile, conservando i componenti su ghiaccio o in un blocco refrigerante.

19. Il flusso di lavoro in laboratorio deve procedere in un'unica direzione (Workflow unidirezionale), muovendo verso le aree di amplificazione ed analisi dati. Non riportare campioni, attrezzatura e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti.

20. Si raccomanda l'uso di materiale monouso in plastica per la preparazione dei componenti liquidi o per il trasferimento dei componenti nelle stazioni di lavoro robotizzate, per evitare la contaminazione crociata.

21. I materiali di rifiuto prodotti utilizzando il kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalle procedure di estrazione dei campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima dello smaltimento. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.

22. Spargimenti accidentali da campioni o da operazioni in corso devono essere eliminati con carta assorbente imbevuta di candeggina per uso domestico e poi con acqua. La carta assorbente utilizzata deve essere gettata negli appositi contenitori per rifiuti di laboratorio od ospedalieri.

23. Gli altri materiali di rifiuto generati (ad esempio: puntali usati per campioni) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti in conformità alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

H. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il lavaggio broncoalveolare (BAL) deve essere raccolto in provette di polipropilene senza aggiunta di conservanti

2. I campioni devono essere trasportati e conservati a +2/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni.

3. Non congelare i campioni di lavaggio broncoalveolare per evitare lisi delle cellule e perdita del titolo del DNA batterico.

4. L'emoglobina e le mucoproteine del DNA estratto da campioni di BAL potrebbero inibire la reazione di amplificazione.

5. I campioni di lavaggio broncoalveolare devono essere pretrattati prima dell'estrazione del DNA come descritto nel paragrafo M.

6. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati.

I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

Master mix:

Componente A. Pronto all'uso. Miscelare bene nel vortex prima dell'uso e centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.

ATTENZIONE: il componente A è fotosensibile. Proteggerlo da esposizione a luce intensa.

Primer/probe:

Componente B.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il componente B liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

ATTENZIONE: il componente B è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

Acqua MG:

Componente C. Pronto all'uso.

Controllo negativo:

NTC. Pronto all'uso.

Controlli positivi:

Componente CTRL-H.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il CTRL-H liofilizzato con il volume del componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

Componente CTRL-L.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il CTRL-L liofilizzato con il volume del componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

Controllo interno:

I.C.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'IC liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

L. STRUMENTI E ACCESSORI USATI IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le **micropipette** devono essere calibrate e sottoposte a regolare decontaminazione (alcol ad uso domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti ad uso ospedaliero) nelle parti che possono accidentalmente venire in contatto con il campione. Devono inoltre essere regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% e un'esattezza di +/-5%.
2. **Dispositivo di estrazione:** il kit LEPDNA.CE è destinato all'uso esclusivo con QIAamp DNA Minikit Codice.51306 (QIAGEN) e Nucleospin Tissue kit Codice: 740952 (Macherey-Nagel). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.
3. **Software termociclatori Real-Time e strumenti.** Il kit LEPDNA.CE è destinato all'uso esclusivo con i termociclatori Real Time ABI 7500, software SDS versione 1.3.1 (Applied Biosystems), con MX3000P, software MxPro versione 4.01 (Stratagene). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

M. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza stampata sull'etichetta esterna della scatola contenente il kit. Non utilizzare il kit se è scaduto.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili ad occhio nudo o aggregati. Controllare che sul fondo dei flaconi contenenti i componenti liofilizzati sia presente un aggregato ben formato. Accertarsi che il prodotto non sia danneggiato durante il trasporto e che non sia presente alcuna fuoriuscita di liquidi all'interno della scatola.
3. Dissolvere i componenti liofilizzati con la giusta quantità di Componente C (acqua "Molecular Grade") come descritto nel relativo paragrafo (I).
4. Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
5. Seguire rigorosamente le istruzioni contenute nel manuale dello strumento fornito dai produttori per la corretta impostazione dei termociclatori real-time.
6. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume corretto.
7. Controllare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
8. In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

N. PROCEDURA D'ANALISI

Il test deve essere eseguito secondo le istruzioni di seguito riportate.

N. 1 Pretrattamento del campione

- Trasferire 1 ml max di campione in una provetta sterile

- Aggiungere 50 microlitri per ml di soluzione mucolitica N-acetil cisteina (concentrazione: 100 mg/ml)
- Miscelare energicamente su vortex per 15 secondi
- Incubare a +2 / +8° per 10 minuti
- Agitare energicamente il campione finché non è completamente sciolto
- Centrifugare a 2500 rpm/min. per 15 minuti
- Gettare i surnatanti
- Procedere all'estrazione del DNA.

N.2 Estrazione del DNA

La fase estrattiva del DNA genomico della Legionella pneumophila deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

Materiali	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Lavaggio broncoalveolare	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™
Lavaggio broncoalveolare	NucleoSpin Tissue Kit	740952	MN™

L'estrazione del DNA genomico della Legionella pneumophila da campione di lavaggio broncoalveolare deve essere eseguita dall'utilizzatore finale, in base alle istruzioni del produttore, con i seguenti kit:

• **QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)**

Note importanti: il protocollo "Purificazione del DNA dal tessuto" descritto nelle istruzioni del produttore deve essere applicato con le seguenti modifiche:

1. *iniziare il protocollo dalla fase n°2a utilizzando un campione di pellet ottenuto come descritto nel paragrafo N.1 (Pretrattamento del campione) invece del campione di tessuto.*
2. *Nella fase n° 11 utilizzare 100 ul di tampone di eluizione invece di 200 ul.*

• **NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)**

Nota importante: seguire il "Protocollo standard per tessuti umani o animali e cellule in coltura" (Protocollo 5), descritto nelle istruzioni del produttore, applicando le seguenti modifiche:

1. *Iniziare il protocollo dalla fase n°1 paragrafo **Cellule in coltura "Pre-lisi"** utilizzando il pellet ottenuto come descritto nel paragrafo N.1 (pre-trattamento del campione)*

Il DNA estratto dai campioni, non utilizzato nella sessione di analisi, deve essere conservato adeguatamente nello stato congelato (da -20°C a -80°C).

Nota importante: nella procedura di isolamento, il controllo interno del kit LEPDNA.CE può essere usato come controllo di estrazione.

Il valore Ct del controllo interno per i campioni negativi viene usato per stabilire se la procedura di estrazione del DNA è stata eseguita correttamente (vedere il paragrafo Q).

Per questa applicazione, aggiungere 5 µl di I.C. alla miscela di tampone di lisi e campione e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione.

N.3 Impostazione della reazione

Il kit **LEPDNA.CE** è destinato all'uso esclusivo con ABI 7500, software SDS versione 1.3.1 (Applied Biosystems), con MX3000P, software MxPro versione 4.01 (Stratagene).

N.3.1 Preparazione della PCR

Importante: nel paragrafo O è riportato un esempio di schema di dispensazione, al quale occorre fare riferimento prima di iniziare a leggere le seguenti istruzioni.

- Preparare i componenti come descritto nel paragrafo I.
- Preparare il numero richiesto di provette di reazione oppure una piastra di reazione a 96 pozzetti per i campioni in esame e per i controlli positivi (preparati come descritto nel paragrafo I).

Nota importante: usare solo provette ottiche o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori real-time.

- Prendere in considerazione il fatto che i campioni dovrebbero essere possibilmente analizzati in duplicato.
- Includere almeno 1 provetta/pozzetto per il controllo negativo (NTC).
- Preparare la **miscela di amplificazione** per **campioni, NTC e controlli positivi (CTRL-H, CTRL-L)** come da tabella seguente:

Preparazione della miscela di amplificazione

(I.C. come controllo di amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
A	Master mix	12,5 µl	150 µl
B	Primer/probe	2 µl	24 µl
I.C.	Controllo interno	0,5 µl	6 µl
Volume tot		15 µl	180 µl

Nota importante: se il controllo interno è stato aggiunto durante la procedura d'isolamento del DNA, preparare la **miscela di amplificazione per campione, NTC e controlli positivi (CTRL-H, CTRL-L)** come descritto nella tabella seguente:

Preparazione della miscela di amplificazione

(I.C. come controllo di estrazione/amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
A	Master mix	12,5 µl	150 µl
B	Primer/probe	2 µl	24 µl
C	Acqua MG	0,5 µl	6 µl
Volume tot		15 µl	180 µl

N.3.2 Procedura di amplificazione

- Dispensare 15 µl di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastrella.
- Aggiungere 10 µl di **campione, NTC, CTRL-H e CTRL-L** alle provette di reazione.
- Chiudere bene le provette di reazione.
- Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 rpm/min.
- Non lasciare le provette di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti ed esposte alla luce (coprire le provette).
- Caricare le provette di reazione nel supporto termoblocco del termociclatore real-time.
- Dopo le operazioni d'impostazione descritte nel paragrafo N4 (Programmazione dello strumento), iniziare la sessione di analisi del termociclatore.

Nota importante: i componenti liofilizzati dopo scioglimento nel componente C (acqua MG) sono stabili per non più di 3 ore, se conservati su ghiaccio oppure a una temperatura di 2°-8°C.

Il volume inutilizzato di componente B, CTRL-H, CTRL-L e I.C. può essere congelato a -20°C ed utilizzato come descritto nella Sezione E.

N.4 Programmazione dello strumento

Per la programmazione dello strumento, fare riferimento al manuale d'istruzioni della strumentazione fornito dai produttori.

Nota importante: per Mx3000P impostare "Filter set gain settings" come segue: ROX = x1, FAM = x8, JOE = x1. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

N.4.1 Profilo termico

Il profilo termico è riportato nella seguente tabella:

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

NOTA IMPORTANTE: (*) fase per la raccolta dei dati in tempo reale

ATTENZIONE: prestare attenzione a configurare il termociclatore real-time con il profilo termico corretto, seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

N.4.2 Scelta dei fluorofori

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali dei termociclatori real-time (ABI 7500, MX3000P Stratagene), scegliere i fluorofori indicati nella tabella riportata qui sotto:

Determinazione	Reporter	Quencher
Legionella pneumophila	FAM	Non fluorescente
Controllo interno (I.C.)	JOE	Non fluorescente
Passive Reference	ROX	Non presente

ATTENZIONE: prestare attenzione durante la configurazione del termociclatore real-time con le impostazioni corrette, seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

O. SCHEMA DEL TEST

Qui sotto è riportato un esempio di schema di dispensazione per l'analisi qualitativa:

Micropiastrella o provette					
	1	2	3	4	5
A	CTRL-H 1,32x10 ⁴ copie/µl	Campione 6			
B	CTRL-L 1,32x10 ⁴ copie/µl	Campione 7			
C	NTC	Campione 8			
D	Campione 1	Campione 9			
E	Campione 2	Campione 10			
F	Campione 3	Campione 11			
G	Campione 4	Campione 12			
H	Campione 5	Campione 13			

Legenda: NTC = controllo negativo CTRL-H, CTRL-L = controlli positivi per il DNA di Legionella pneumophila, Campione 1,2,3 = campioni in esame.

P. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

P.1 Impostazioni preanalisi

Prima di iniziare l'analisi:

- impostare il "baseline" (livello di fluorescenza di base) come indicato qui sotto:

"Baseline"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Manual: 3-15
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptive Baseline (Do not use Mx4000 v1.00 a v3.00 algorithm)

- Impostare manualmente la "Threshold" di fluorescenza FAM/JOE.

FAM "Threshold"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.075
STRATAGENE™ MX3000P®	0.075

JOE "Threshold"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.075
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02

P.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sui CTRL-H/CTRL-L ogni volta che il kit viene usato per verificare se i rispettivi valori Ct sono quelli previsti e riportati nella tabella seguente.

Controllo FAM	Requisiti
CTRL-H	$19 \leq Ct$ (ciclo soglia) $< 23,5$
CTRL-L	$29 \leq Ct$ (ciclo soglia) $< 33,5$

Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione, si parte dal presupposto che la fluorescenza FAM (valore Ct positivo/negativo) e la fluorescenza interna convalidino la determinazione del LE PDNA come descritto nella tabella seguente:

L Pneumophila FAM	JOE controllo interno	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	+	CORRETTO
	-	CORRETTO*
CAMPIONE NEGATIVO	Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**

*Una concentrazione iniziale elevata del DNA della Legionella pneumophila nel campione (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale di fluorescenza RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.

** Potrebbero essersi verificati problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficiente o assente) o durante la fase di estrazione (presenza di inibitori o campione iniziale contenente un numero di cellule insufficiente) con un risultato conseguentemente errato. La procedura di analisi deve essere ripetuta partendo dalla fase di estrazione con un nuovo campione proveniente dallo stesso paziente.

I risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione i sintomi clinici e gli altri parametri di laboratorio correlati alle condizioni del paziente.

Sono possibili i seguenti risultati:

	FAM	IC	non valido	CONTROLLO
CAMPIONE sconosciuto	+	+	RISULTATO CORRETTO <i>Risultato</i>	
CAMPIONE sconosciuto	-	Ct>40 oppure non det	ATTENZIONE! POSSIBILI DA DI: inibizione, errore nella procedura o mancato funzionamento	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato

			mento degli strumenti	correttamente. 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta. 7. le procedure di estrazione siano state eseguite correttamente.
CAMPIONE sconosciuto	-	+	RISULTATO CORRETTO <i>Negativo</i>	
CTRL-H/CTRL-L	+	+	RISULTATO CORRETTO	
CTRL-H/CTRL-L	-	Ct>40 oppure non det	ATTENZIONE! POSSIBILI DA DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente. 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta.
CTRL-H/CTRL-L	-	+	ATTENZIONE! POSSIBILI DA DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 4. il kit sia stato conservato correttamente.
NTC	-	+	RISULTATO CORRETTO	
NTC	+	+	ATTENZIONE! POSSIBILI DA DI: contaminazione	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a regolari intervalli; 4. il kit sia stato conservato correttamente;
NTC	+	Ct>40 oppure non det	ATTENZIONE! POSSIBILI DA DI: contaminazione	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a regolari intervalli; 4. il kit sia stato conservato correttamente;

Note importanti:

1. l'interpretazione dei risultati dovrebbe essere effettuata dietro supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio e interpretazioni errate.
2. Quando i risultati del test sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico porre la massima attenzione per evitare trasferimenti di dati erronei.

Se si presentano uno o più problemi tra quelli precedentemente descritti, dopo il controllo informate il supervisore di qualsiasi problema residuo per l'eventuale adozione di ulteriori misure.

R. PERFORMANCE

La valutazione delle performance è stata eseguita in conformità a quando indicato nelle specifiche tecniche interne o ITS.

La valutazione delle performance è stata condotta presso i laboratori di DiaPro su materiali forniti dal laboratorio medico di riferimento.

R.1 SENSIBILITÀ ANALITICA

Per i metodi qualitativi, la sensibilità analitica può essere espressa come **limite di determinazione**.

Limite di determinazione (Limit of detection-LOD): è la quantità minima del target che può essere determinata da un sistema di analisi con una probabilità dichiarata.

Per i test NAT, viene espresso come concentrazione minima dell'**analita** che, dopo ripetizioni multiple del test, fornisce un risultato positivo.

Il **limite di determinazione (LOD)** si stabilisce analizzando diluizioni seriali contenenti concentrazioni note dell'analita.

Il **LOD** è la concentrazione minima di analita che può essere determinate in maniera coerente (ad es. in $\geq 95\%$ dei campioni in condizioni di laboratorio di routine).

Nel kit LEPDNA.CE, il limite quantitativo **LOD** è stato determinato mediante analisi di 24 replicati (8 replicati in tre corse diverse), della diluizione massima dell'analita che può essere rilevata nel 100% di essi.

I risultati sono i seguenti:

Limite di determinazione LOD (p=0,05)	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	1 copie/ µl
STRATAGENE™ MX3000P®	1 copie/ µl

Ciò significa che una concentrazione di 1E+00 copie/ µl viene sempre determinata dagli strumenti elencati sopra

R.2 SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica è la capacità del metodo di determinare solo la sequenza target del DNA.

La specificità analitica dell'analisi del LEPDNA è stata studiata come segue:

1. il set di primer/probe è stato scelto analizzando la sequenza target del genoma con un software appropriato (LionSoft v.1.0 fornito da Biotools e Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
2. Il set primer/probe e la sequenza bersaglio del genoma sono stati controllati con il software "BLAST", per verificare se qualcuna delle sequenze di nucleotidi depositate nelle banche dei genomi in tutto il mondo presenti qualche omologia con la legionella pneumophila, e con il software "ClustalX", per confrontare le sequenze bersaglio del genoma dei diversi genotipi di Legionella pneumophila.
3. La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
4. I campioni di pazienti con infezioni dovute a organismi potenzialmente interferenti sono stati ottenuti da un centro medico di riferimento.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	non valido
Mycobacterium sp	negativo
Neisseria meningitidis	negativo
Pseudomonas earuginosa	negativo
Streptococco pneumoniae	negativo
Mycoplasma pneumoniae	negativo
Klebsiella pneumoniae	negativo
Legionella longbeachae	negativo
Legionella Micdadei	negativo

R.3 SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ

R.3.1 Specificità Diagnostica:

La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo dia un risultato positivo in assenza di un marker bersaglio. Così il **vero campione negativo** è un campione sicuramente negativo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico. Questo parametro è stato studiato esaminando 10 lavaggi broncoalveolari negativi di DNA di L. pneumophila

VERI NEGATIVI	10
FALSI POSITIVI	0
CAMPIONI TOTALI	10
SPECIFICITÀ %	100

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una specificità diagnostica $\geq 99\%$.

R.3.2 Sensibilità Diagnostica

La **sensibilità diagnostica** è la probabilità che il dispositivo dia un risultato positivo in presenza del marker bersaglio. Così il **vero risultato positivo** è un campione sicuramente positivo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Nel kit codice LEPDNA.CE questo parametro è stato studiato esaminando lavaggi broncoalveolari positivi per il DNA della L. pneumophila in duplicato in una stessa analisi, poi è stata calcolata la percentuale (%) dei campioni positivi.

VERI POSITIVI	10
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	10
SENSIBILITÀ %	100

Sulla base dei risultati ottenuti, la sensibilità diagnostica del sistema è stata calcolata come 100%.

Sensibilità diagnostica	100 %
Specificità diagnostica	> 99.5 %

R.4 PRECISIONE

La precisione mostra il grado di attendibilità del sistema. Ogni procedura di misurazione ha una variazione casuale intrinseca chiamata "errore casuale". L'errore casuale non ha un valore numerico, ma è determinato dalla dispersione della misurazione espressa come deviazione standard (DevSt) e coefficiente di variazione (CV%). Normalmente,

la precisione di un test si riferisce alla concordanza tra le misurazioni ripetute dello stesso materiale.

Nel kit codice LEPDNA.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. Il CTRL-H e il CTRL-L in 8 replicati sono stati analizzati nella stessa sessione (intra-assay) e in tre sessioni diverse (inter-assay).

Le variabilità intra-assay e inter-assay sono state calcolate sulla base dei risultati ottenuti.

In assenza di parametri stabiliti nella Direttiva Europea IVD CTS abbiamo identificato il seguente valore di accettabilità per il DNA della *Legionella pneumophila*:

coefficiente di variazione intra-assay (CV%) ≤ 10%;

coefficiente di variazione inter-assay (CV%) ≤ 10%.

S. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utilizzatore di questo kit di leggere attentamente e comprendere l'insero allegato alla confezione. È necessaria la massima osservanza del protocollo per ottenere risultati attendibili. In particolare, un'accurata operazione di pipettaggio del campione e del reagente, l'applicazione di un corretto flusso di lavoro e un'attenta programmazione della fase di amplificazione sono fondamentali per una determinazione accurata e riproducibile del DNA della *Legionella pneumophila*.

Si raccomanda quindi che riservatezza, supporto appropriato e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

T. BIBLIOGRAFIA

1. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. B. 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. Simboli

LEGENDA			
	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto		Fabbricante
	Data di scadenza		Numero di test
	Marchio di conformità CE		Data di produzione

Tutti i Prodotti IVD sono fabbricati dall'Azienda nell'ambito e sotto il controllo di un Sistema di Qualità certificato conforme alla Norma ISO 13485. Ogni lotto è sottoposto ad una procedura di Controllo di Qualità e rilasciato alle vendite solo se conforme alle specifiche tecniche comuni Europee e ai criteri di accettabilità definiti.

CE



CONTATTI DISTRIBUTORE

4BShop Lab Srls

-  info@4BShopLab.com
-  www.4BShopLab.com
-  +39.0371.18.56.643

FABBRICANTE

Dia.Pro -Diagnostic Bioprobes Srl



 **100% MADE IN ITALY**

EN ISO 13485:2013 Certified

