

LEGIONELLA SP IFA IgG

Für die *In vitro* Diagnostik

PLESPG: Kit für die indirekte Antikörper-Immunfluoreszenz (IFA) zur Bestimmung von *Legionella pneumophila* Serogruppen 1-14, *L. bozemanii* Serogruppen 1 und 2, *L. longbeachae* Serogruppen 1 und 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. micdadei* und *L. jordanis* IgG-Antikörpern, in humanem Serum/Plasma.

EINLEITUNG:

Obwohl über 30 Spezies nachgewiesen wurden, ist die Serogruppe 1 der *Legionella pneumophila* für die meisten Infektionen beim Menschen verantwortlich. Eine typische Pneumonie wird häufig mit Systemmanifestationen assoziiert. Sie ist für 10% der Pneumonien, die sowohl im menschlichen Zusammenleben als auch in Krankenhäusern erworben werden, verantwortlich. Während der Infektion kommt es zu einer Immunreaktion gegen das Antigen der *L. pneumophila*-Gruppe. Die einzige standardisierte Technik bei der serologischen Diagnose der Krankheit ist der IFA. Zur Bestätigung einer serologischen Diagnose ist der Nachweis der Serokonversion erforderlich, denn auch in der gesunden Bevölkerung sind hohe Titer zu finden. Ein hoher Titer in einer einzigen Serumprobe zusammen mit klinischen Äußerungen ist jedoch krankheitsverdächtig. Die Verwendung von Antigen-Mischungen der verschiedenen Serogruppen von Legionella führt zu häufigen Serokonversionen, die sich beim Einsatz einwertiger Antigene nicht bestätigen.

PRINZIP DES TESTS:

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz basiert auf der Reaktion der Antikörper der Probe mit dem an die Oberfläche des Objektträgers gebundenen Antigen. In der Probe vorhandene spezifische Antikörper reagieren mit dem Antigen, nicht-bindende Immunglobuline werden im Waschprozess beseitigt. Im nächsten Schritt reagiert der Antigen-Antikörper-Komplex mit Fluorescein- markiertem Antihumanglobulin und wird durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

EIGENSCHAFTEN DES KITS:

Alle Reagenzien mit Ausnahme von PBS werden gebrauchsfertig geliefert. Die Kit-Bestandteile sind zur leichteren eindeutigen Identifizierung mit einer Nummer versehen. Im Versuchsverfahren werden die Nummern der in jedem Abschnitt zu verwendenden Reagenzien angegeben.

BESTANDTEILE DES KITS:

- 1 VIRCELL LEGIONELLA SP SLIDE: 10 Objektträger zu je 30 Feldern: 10 Felder mit *L. pneumophila* Serogruppen 1-6, 10 Felder mit *L. pneumophila* Serogruppen 7-14 und 10 Felder mit *L. bozemanii* Serogruppen 1 und 2, *L. longbeachae* Serogruppen 1 und 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. micdadei* und *L. jordanis*, durch Wärme passiviert und mit Aceton fixiert. Bei 0,5% in Dottersack suspendiert, um die Haftung des Antigens zu verbessern und die Bakterienaggregation zu verhindern.
- 2 VIRCELL PBS: 1 Ampulle zur Zubereitung von 1 l PBS pH 7,2.
- 3 VIRCELL LEGIONELLA SP IgG POSITIVE CONTROL: 200 µl positives Testserum für IgG (enthält Natriumazid).
- 4 VIRCELL LEGIONELLA SP NEGATIVE CONTROL: 200 µl negatives Testserum (enthält Natriumazid).

5 VIRCELL ANTI-HUMAN IgG FITC CONJUGATE: 2 Ampullen mit 1,1 ml Fluorescein-markiertem Anti-Human-IgG-Konjugat in Phosphatpuffer mit Eiweißstabilisator, Evans-Blau und Natriumazid.

6 VIRCELL MOUNTING MEDIUM: 3 ml Eindeckmedium: gepuffertes Glycerol (enthält Natriumazid).

Bei 2-8°C lagern, Verfallsdatum überprüfen

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:

- Geeignete Präzisionspipetten.
- Inkubator/temperierbares Bad.
- Destilliertes Wasser.
- 24x60 mm großes Objektdeckglas.
- Fluoreszenzmikroskop und nach Herstellerempfehlungen geeignete Filter.
- Feuchte Kammer.

LAGERBEDINGUNGEN:

Das Kit ist bei der angegebenen Temperatur bis zum Verfallsdatum stabil. Verwenden Sie die Komponenten des Kits nicht mehr nach Ablauf des Verfalldatums. Das angegebene Verfalldatum gilt immer dann, wenn die Komponenten geschlossen bei der angegebenen Temperatur gelagert werden.

LAGERUNG DER ANGEBROCHENEN REAGENZIEN:

Reagenz	Stabilität
Rekonstituierte PBS	4 Monate bei 2-8°C, stets innerhalb des Verfalldatums
VIRCELL SLIDE	Nach dem Öffnen am gleichen Tag verwenden
Übrige Bestandteile	Datumsangabe auf Verpackung bei 2-8°C

STABILITÄT UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN:

Alle Reagenzien zur Vermeidung mikrobiischer Verunreinigungen unter aseptischen Bedingungen verwenden. Nur zur Testdurchführung erforderliche Menge an PBS, Kontrollen und Konjugat benutzen. Restliche Lösung niemals in die Ampullen zurückgeben. Die PBS muss nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C gelagert und darf bei Trübung nicht verwendet werden.

VIRCELL, S.L. ist nicht verantwortlich für Fehler, die durch eine falsche Handhabung der Reagenzien dieses Kits verursacht wurden.

EMPFEHLUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN:

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur PBS, Objektträger und Eindeckmedium sind zu gleichwertigen Substanzen anderer Artikelnummern und Chargen von IFA VIRCELL kompatibel. Die übrigen Bestandteile sind unter verschiedenen Kits kompatibel, wenn deren Chargennummer übereinstimmt.
3. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.



4. Keine beschädigten Kits verwenden.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Konjugat und Kontrollen dieses Kits enthalten Material tierischen Ursprungs. Die Kontrollen enthalten zudem Substanzen humanen Ursprungs. Obwohl die Humanserum-Kontrollen dieses Kits auf Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg), Hepatitis C Antikörper und Human Immunodeficiency Virus Antikörper getestet und für negativ befunden wurden, sollten Kontrollseren und Patientenproben als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Vertiefungen der Titerplatte sind mit inaktiviertem Antigen von Legionella sp beschichtet. Trotzdem sollten auch sie als potentiell infektiös angesehen und mit der nötigen Vorsicht behandelt werden. Gegenwärtig kann keine Methode eine vollständige Abwesenheit von infektiösen Bestandteilen versichern. Alle Materialien sollten wie potentiell infektiöse Stoffe entsorgt werden. Beachten Sie die örtlichen Bestimmungen für die Entsorgung von klinischem Material.
7. Aufgrund des Natriumazidgehalts (Konzentration <0.1%) ist der Kontakt von Konjugat, Eindeckmedium und Kontrollen mit Säuren und Schwermetallen zu vermeiden.
8. Aufgrund des Glycerolgehalts ist der Kontakt des Eindeckmediums mit Säuren zu vermeiden. Keinen hohen Temperaturen aussetzen.
9. Evans-Blau (Konzentration <0.1%) ist krebserregend. Haut- und Augenkontakt vermeiden. Betroffene Fläche bei Kontakt mit Wasser abwaschen und einen Arzt rufen.
10. Nur die in diesem Prospekt beschriebenen Protokolle benutzen. Entsprechen die in diesem Test eingesetzten Inkubationsintervalle oder –temperaturen nicht den Angaben, können die Ergebnisse fehlerhaft sein.
11. Die Kreuzverunreinigung durch Serum verschiedener Patienten auf einem Objektträger kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zur Vorbeugung erforderliche Vorkehrungen treffen.
12. Die Optik des Mikroskops, die Wartung und die Art der Lichtquelle können die Fluoreszenzqualität beeinträchtigen.
13. Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich Raumtemperatur aussetzen.
14. Jeder Objektträger ist nur einmal zu benutzen. Er darf weder geteilt, noch dürfen unbenutzte Felder wiederverwendet werden.
15. Das Kit enthält Glaselemente, die bei Bruch zu Körperverletzungen führen können. Vorsichtig damit umgehen.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG:

Das Blut muss unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktionstechniken von erfahrener Personal entnommen werden. Zur Vermeidung von Probenverunreinigungen wird der Einsatz aseptischer oder steriler Techniken empfohlen. Die Sera sind bei 2-8°C gekühlt zu lagern, wenn sie innerhalb der sieben auf die Entnahme folgenden Tage verarbeitet werden. Verzögert sich die Verarbeitung, sind sie bei -20°C einzufrieren, wobei unnötiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte, da dies zu einer Verringerung des Immunglobulintiters und insbesondere von IgM führen könnte. Keine hyperlipämischen oder verunreinigten Sera verwenden. Partikel aufweisende Sera können durch Zentrifugieren geklärt werden.

TESTVORBEREITUNG:

Das einzige vor der Testdurchführung vorzubereitende Reagenz ist die PBS. Hierfür den Inhalt von Ampulle **2** auf 1 Liter destilliertes Wasser zugeben und bis zur vollständigen

Auflösung schütteln. Nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C aufbewahren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Reagenzien und Objektträger vor deren Öffnung auf Raumtemperatur bringen.
2. 1/64 und 1/128-Verdünnung der Sera vornehmen, hierfür 10 µl Serum in 630 µl PBS **2** geben; als 1/64. Lösung beschriften, mit 50 µl PBS (1/128-Lösung) doppelt verdünnen. Die Testsera **3** und **4** dürfen nicht verdünnt werden.
3. In jedes der drei Felder von zwei Reihen des Objektträgers **1** 5 µl der 1/64 und 1/128-Verdünnung geben. Ebenso mit den Positiv- und Negativ-Kontrollen **3** und **4** verfahren.
4. 30 Minuten lang bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
5. Objektträger kurz mit PBS spülen (vermeiden, PBS direkt auf die Felder zu schütten). Objektträger 10 Minuten lang in PBS tauchen. Leicht mit destilliertem Wasser spülen.
6. Objektträger **1** abtrocknen lassen.
7. Auf jedes Feld 5 µl Anti-Human-IgG-Lösung **5G** zugeben. (Erfordert keine Verdünnung).
8. Schritte 4, 5 und 6 wiederholen.
9. Auf jedes Feld einen kleinen Tropfen Eindeckmedium **6** zugeben und Deckglas aufsetzen.
10. So schnell wie möglich bei 400x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Andernfalls bis zur Betrachtung höchstens 24 Stunden lang bei 2-8°C dunkel lagern.
11. Für den Fall der Positivität bei diesen Screening-Verdünnungen Sera erneut unter Verwendung von bis 1/2048-Verdünnungen untersuchen.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE:

Jede Charge wird einer internen Qualitätskontrolle unterzogen, bevor einer Freigabe unter Spezifikationen zugestimmt wird, die strenger als die für den Anwender sind. Die endgültigen Ergebnisse der Qualitätskontrolle jedes einzelnen Artikels sind erhältlich.

Dem Kontrollmaterial liegen als Referenz nachweislich intern geprüfte Serumplatten zugrunde.

TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER:

In jeden Versuchsdurchgang sollte das positive und negative Testserum aufgenommen werden. Das gestattet die Validierung des Tests und des Kits. Das vorhandene Fluoreszenzmuster sollte folgendermaßen aussehen:

Positive Kontrolle: Fluoreszenz mit bazillärer Morphologie, apfelgrün.

Negative Kontrolle: Fehlende Fluoreszenz.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Der Serumtiter ergibt sich aus der höchsten Verdünnung, bei der eine positive Reaktion festzustellen ist.

Die Reaktion ist positiv, wenn fluoreszenz mit bazillärer Morphologie, apfelgrün festgestellt wird.

Die Reaktion ist negativ, wenn fehlende Fluoreszenz festgestellt wird.

Von den in der dieser Beilage definierten Fluoreszenzmustern abweichende Ergebnisse dürfen nicht als positiv interpretiert werden.

Das Verhalten von IgG- und IgM-Antikörpern bei Primär- und Reinfektionen ist unterschiedlich. Bei einer Primärinfektion treten IgG und IgM in fast allen Fällen auf (IgM erscheint vor IgG). Bei einer Reinfektion treten in allen Fällen keine IgM-



Antikörper auf und die IgG-Erkennung ist die einzige Möglichkeit der Diagnose. Bei vielen Krankheiten können im ganzen Leben des Patienten hohe IgG-Titer bestehen, während sich IgM im Allgemeinen nur zwei oder drei Monate nach der Krankheit im Serum hält. Sie sind daher ein wirkungsvoller Marker für eine kürzliche Infektion.

Bei den IgG-Bestimmungen ist zur Bestätigung einer kürzlichen Infektion der Serokonversionsnachweis erforderlich. Wird eine einzige Serumprobe verwendet, sind zur angemessenen Ergebnisbewertung unbedingt jahreszeitliche Schwankungen, das Alter des Kranken und die Prävalenz der Krankheit in der Gegend zu berücksichtigen. Um das Testergebnis als positive interpretieren zu können, muss sich der Titer des Serum zwischen akuter Krankheitsphase und Rekonvaleszenzphase um mindestens den Faktor 4 erhöhen.

EINSCHRÄNKUNGEN:

- Der Kit ist für die Untersuchung von humanem Serum/Plasma.
- Dem Anwender des Tests wird empfohlen, diese Gebrauchsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig zu lesen und die einzelnen Schritte nachzuvollziehen. Die strikte Einhaltung der Gebrauchsanleitung ist notwendig, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Insbesondere das korrekte Pipettieren der Probe und der Reagenzien sowie sorgfältiges Waschen und die Einhaltung der angegebenen Inkubationszeiten sind für die Genauigkeit der Ergebnisse essenziell.
- Die Ergebnisse der Proben sollten immer in Verbindung mit den klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden.
- Dieser Test zeigt nicht den Infektionsort. Er kann eine Erregerisolierung nicht ersetzen.
- Wenn kein signifikantes Ansteigen des Antikörper-Niveaus vorhanden ist, bedeutet dies nicht, dass eine Infektion ausgeschlossen werden kann.
- Sehr früh im Verlauf einer Infektion genommene Proben können eventuell keine erkennbaren IgG-Anteile enthalten. In diesen Fällen wird die Durchführung eines Versuchs zur IgM-Bestimmung oder eine zweite Probennahme nach Ablauf von 14 bis 21 Tagen empfohlen, die dann zur Bestimmung einer Serokonversion parallel zur Originalprobe zu testen ist.
- Bei der Erkennung von IgG bei Neugeborenen erzielte Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, da Mutter-IgG vor der Geburt passiv von der Mutter auf den Fetus übertragen wird. Bei Kindern unter sechs Monaten ist die IgM-Bestimmung der bessere Infektionsindikator.
- Für die Diagnose einer Infektion sollten niemals nur die Ergebnisse der Antikörperbestimmung einer einzigen Probe herangezogen werden. Eine paarweise Testung der Proben (akut und latent) sollte erfolgen, um eine Serokonversion oder einen signifikanten Titeranstieg nachzuweisen.
- Manche Sera können Antikörper aufweisen, die mit Ei-Antigenen reagieren und führen zu einer Bodenfluoreszenz auf dem zur Fixierung des Antigens an den Objektträger benutzten Dottersack. In diesen Fällen können diese Seren nicht mit der Immunfluoreszenztechnik analysiert werden.
- Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

LEISTUNGSDATEN:

• SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT:

Gegenüber von der indirekten Antikörper-Immunfluoreszenz einer anderen Handelsfirma wurden 41-Serum/-Plasma-Proben mit LEGIONELLA SP IFA IgG getestet und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

	Probe NR	Sensitivität	Spezifität
IgG	41	87,5%	93,9%

Die Sera, die keine spezifische Reaktion aufwiesen, wurden aus den Endberechnungen ausgeschlossen.

• INTRA-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurde 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und unter gleichen Arbeitsbedingungen einzeln in Fünfergruppen in einem einzigen von der gleichen Person durchgeführten Versuch pipettiert.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• INTER-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurden 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und einzeln unter 5 verschiedenen Bedingungen pipettiert, bei denen sich die Person oder der Durchführungstag änderten.









In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• KREUZREAKTIVITÄT UND INTERFERENZEN:

Gegenüber anderen Bakterien der Syndromgruppe (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Coxiella burnetii*) und antinuklearen Antikörpern wurden 12 als positiv bekannte Proben ausgetestet.

Die getesteten Proben ergaben negative Ergebnisse und bewiesen dabei die spezifische Reaktion des Versuchs ohne von den beschriebenen Stoffen verursachte Kreuzreaktion oder Interferenzen.

BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLE:

	Für die <i>In vitro</i> Diagnostik
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Bei x-y ² C lagern
	Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
	Chargen-Nummer
	Bestell-Nummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	<X> Vertiefungen



LITERATUR:

1. Bangsborg, J. M., G. Shand, E. Pearlman, and N. Hoiby. 1991. Cross-reactive Legionella antigens and the antibody response during infection. *APMIS* 99:854-65.
2. Bettelheim, K. A., R. V. Metcalfe, and H. Sillars. 1982. Levels of antibody against *Legionella pneumophila* serotype 1 in healthy populations in five areas in New Zealand. *J Clin Microbiol* 16:555-7.
3. Bornstein, N. and J. Fleurette. 1983. Comparison of microagglutination with the indirect immunofluorescence assay for the diagnosis of infection with *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Eur J Clin Microbiol* 2:335-9.
4. De Ory, F., J. M. Echevarria, C. Pelaz, A. Tellez, M. A. Mateo, and J. Lopez. 2000. Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Clin Microbiol Infect* 6:64-9
5. Edelstein, P. H. 1992. Detection of antibodies to Legionella. p.459-466. In N. R. Rose, E. Conway de Macario, J. L. Fahley, H. Friedman, G. H. Penn. (ed.), *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 4^{ed}. ASM, Washington.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

customerservice@vircell.com

ÜBERPRÜFT: 2017/04

