

VIRAPID® LEGIONELLA CULTURE

Für die *In vitro* diagnostik

VR002: Immunochromatographie-Test für die qualitative Bestimmung der *Legionella* Gattung, *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 und *Legionella pneumophila* Serogruppen 1-15 in Proben aus humanen respiratorischen Proben oder Umweltproben erhaltene Bakterienkulturen. 25 Tests.

EINLEITUNG:

Der VIRAPID® LEGIONELLA CULTURE ist ein Immunoassay zur qualitativen Bestimmung der *Legionella*-Gattung, Spezies und Serogruppe. Dieser Test dient der beruflichen Nutzung und Hilfestellung bei der Bestimmung des *Legionella*-Typs, der in einer Bakterienkultur gefunden wird. Diese Proben können zweierlei Herkunft sein: klinischer Herkunft oder aus der Umwelt. Im erstgenannten Fall handelt es sich um Bakterienkulturen, die aus respiratorischen Proben von an atypischer Pneumonie erkrankten Personen erhalten werden. Im zweiten Fall stammen die meisten Proben aus Kühltürmen für Klimaanlage oder aus anderen Behältern, in denen sich Wasser für längere Zeiträume ansammeln kann, wie Kondensatoren für Verdampfung, Schwimmbecken, Wannen usw.

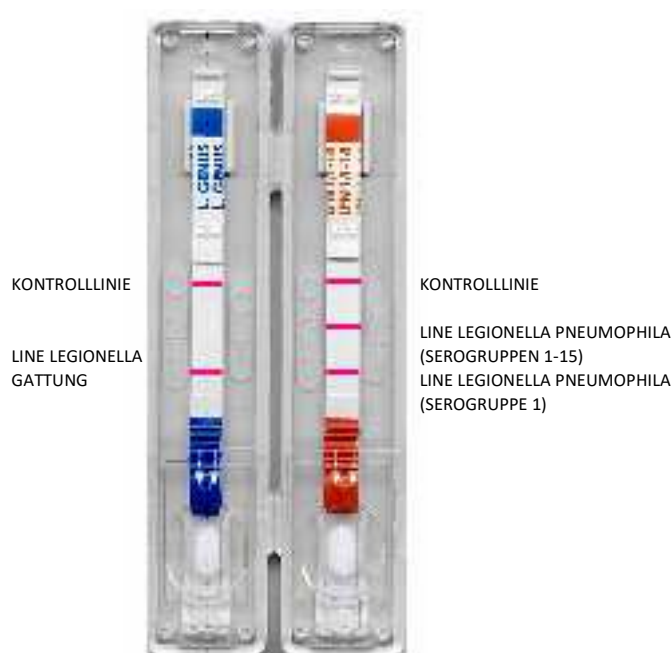
Die Gattung *Legionella* hat ungefähr 50 unterschiedliche Spezies und etwa 80 verschiedene Serogruppen (Serotypen), unter denen sich die *L. pneumophila* und insbesondere die Serogruppen 1, 4 und 6 hervorheben, die für die meisten Fälle von Legionellose verantwortlich sind. Unter diesen tritt die *L. pneumophila* Serogruppe 1 als der Hauptkrankheitserreger in Erscheinung, da sie 80% der Fälle von Legionellose verursacht und sich sowohl in Patienten als auch in Wasserproben von Gebäudeanlagen häufiger isoliert. Verursacht atypische Pneumonie, oft mit systemischen Symptomen. Ist für 10% der Pneumonie-Fälle verantwortlich, und zwar sowohl für diejenigen, die in der Gemeinschaft erworben wurden, als auch für die im Krankenhaus erworbenen Fälle. Während des Verlaufs der Infektion wird eine Immunreaktion auf das Antigen der Gruppe *L. pneumophila* ausgelöst. Dennoch wird das Vorhandensein anderer *Legionella*-Spezies im Wasser ebenfalls als ein potenzieller Risikofaktor betrachtet. Spezies wie *Legionella micdadei*, *Legionella dumoffi*, *Legionella bozemanii*, *Legionella feeli* und *Legionella longbeachae* treten oft in Wasserversorgungsanlagen auf und waren die Ursache einiger bekannter Ausbrüche. Aus all diesen Gründen wird ein Test benötigt, der die *Legionella*-Proben aus einer Kultur klassifizieren und somit die Pathogenität davon bestimmen kann.

Eine Art und Weise zur Bestimmung der *Legionella*-Spezies und Serogruppe war die Verwendung von spezifischen Monoklonen (Mab) aus verschiedenen Teilen der Bakterienwand. Für die Gattung wurden Anti-PAL-Monoklonen verwendet (peptidoglycan-associated-lipoprotein), die allen *Legionella*-Spezies gemeinsam sind; für die Spezies wurde ein Monoklon gegenüber einem gemeinsamen Epitop verwendet, das in allen Serogruppen (Serogruppen 1-15) von *L. pneumophila* vorhanden ist, nämlich das MOMP (Major Outer Membrane Protein), während für die Serogruppe 1 der *L. pneumophila*

Monoklone gegenüber LPS verwenden werden (Lipopolysaccharide).

PRINZIP DES TESTS:

Die Bakterien werden in einem Medium resuspendiert, um die Bestandteile ihrer Wand zu extrahieren. Wenn die extrahierte Probe in die Testmulden gegeben wird, wird das kolloidale Gold löslich gemacht und die erste Immunreaktion zwischen den Bakterienbestandteilen und dem entsprechenden Mab, der an das kolloidale Gold gebunden ist, wird ausgelöst. Diese Komplexe wandern durch die Membran zu den entsprechenden Reaktionslinien (Testlinien), wobei eine rote Linie erscheint, wenn sich der komplementäre Mab, der an die Membran gebunden ist, an diese Komplexe bindet. Jeder Streifen weist eine Kontrolllinie auf, deren Aufgabe es ist, den Versuch zu validieren. Diese muss in jedem Fall erscheinen, auch wenn die Probe negativ ist.



EIGENSCHAFTEN DES KITS:

Wir empfehlen Ihnen, aufmerksam den Abschnitt „Empfehlungen und Vorsichtsmaßnahmen“ durchzulesen. VIRAPID® LEGIONELLA CULTURE identifiziert in nur einem Versuch die wichtigsten *Legionella*-Gruppen, die von klinischer und Umweltbedeutung sind. Der Test wird in wenigen Minuten mithilfe herkömmlicher Materialien und Geräte in Analyselaboren durchgeführt und kann visuell abgelesen werden.

Die Verwendung von Monoklonen gegenüber gemeinsamen Antigenen gewährleistet die Reaktivität auf die verschiedenen Spezies und Serogruppen, die noch nicht getestet wurden.

BESTANDTEILE DES KITS:

- 1 VIRCELL LEGIONELLA CULTURE CASSETTE: 25 Kassetten für die spezifische Detektion der *Legionella*-Gattung, *L. pneumophila* Serogruppe 1 und *L. pneumophila* Serogruppen 1-15.
- 2 VIRCELL LEGIONELLA CULTURE DISRUPTER: 1 Tropfflasche mit Pufferlösung. Enthält Natriumazid.



- 3 VIRCELL LEGIONELLA POSITIVE CONTROL: 1 inaktivierte getrocknete Suspension von *L. pneumophila* Serogruppe 1.
- 4 VIRCELL LEGIONELLA NEGATIVE CONTROL: 1 inaktivierte getrocknete Suspension von *Pseudomonas aeruginosa*.

Bei 2-30°C lagern, Verfallsdatum überprüfen

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten

Thermoblock (optional)
Mikropipetten und entsprechende Spitzen.
Signaluhr
Vortex

LAGERBEDINGUNGEN:

Bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank bei 2 bis 30°C aufbewahren. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie die Komponenten des Kits nicht mehr nach Ablauf des Verfallsdatums. Das angegebene Verfallsdatum gilt nur dann, wenn die Komponenten geschlossen bei 2 bis 30°C gelagert werden.

LAGERUNG DER ANGEBROCHENEN REAGENZIEN:

Reagenz	Stabilität und Lagerung
VIRCELL CASSETTE	Nach dem Öffnen innerhalb von einer Stunde benutzen
VIRCELL DISRUPTER	Bei 2-30°C lagern und vor Ablauf des Verfallsdatums verwenden
VIRCELL POSITIVE CONTROL und VIRCELL NEGATIVE CONTROL rekonstituierten	2 Monate bei 2-8°C lagern

STABILITÄT UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN:

Das Kit ist bis zum Ablauf des Verfallsdatums stabil bei 2-30°C. Verwenden Sie alle Reagenzien unter aseptischen Bedingungen, um eine Kontaminierung durch Mikroben zu verhindern.

VIRCELL, S.L. haftet nicht für die unsachgemäße Verwendung der im Kit enthaltenen Reagenzien.

EMPFEHLUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN:

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Nur Kit-Bestandteile verwenden. VIRCELL CASSETTE, VIRCELL DISRUPTER, VIRCELL POSITIVE CONTROL und VIRCELL NEGATIVE CONTROL verschiedener Chargen oder Kits nicht untereinander austauschen.
3. Die Proben müssen so behandelt werden, als wären sie infektiös, gemäß den Sicherheitsverfahren in Laboratorien.
4. Verwenden Sie Einmal-Schutzhandschuhe, einen Laborkittel und eine Schutzbrille, wenn Sie die Proben handhaben. Waschen Sie sich nach der Handhabung der Proben sorgfältig die Hände.
5. Verwenden Sie das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr.
6. Jedes nicht verwendete Material muss gemäß den geltenden Bestimmungen entsorgt werden.
7. Die Komponenten dieses Geräts können Substanzen tierischen und/oder menschlichen Ursprungs haben. Auch wenn dieses Material nicht infektiös ist, muss es als potenziell infektiös behandelt werden. Das gesamte Material muss als

potenziell infektiös gehandhabt und entsorgt werden. Beachten Sie die lokalen Bestimmungen für klinische Abfälle.

8. Das VIRCELL DISRUPTER enthält Natriumazid. Das Natriumazid kann mit Metallrohren reagieren und explosive Komponenten bilden. Verwenden Sie viel Wasser, wenn Sie die Lösung entsorgen. Beachten Sie die lokalen Bestimmungen für Chemikalienreste.

9. Wenn der Test oder Elemente davon im Kühlschrank aufbewahrt werden, müssen sie vor ihrem Gebrauch Raumtemperatur aufweisen.

10. Die Kassetten sind in den ungeöffneten Verpackungen bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Die Verpackung erst direkt vor dem Gebrauch öffnen.

11. Es können verschiedenen Tests gleichzeitig durchgeführt werden.

12. Für eine korrekte Funktionsweise des Tests muss eine ausreichende Menge der Bakterienkultur in dem mitgelieferten Medium in angemessener Weise resuspendiert werden.

TESTVORBEREITUNG:

Je Probe 8 Tropfen VIRCELL DISRUPTER 2 (~200 µl) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen der Größe 0,5 bis 1,5 ml hinzugeben.

VIRCELL POSITIVE CONTROL und VIRCELL NEGATIVE CONTROL vor der Anwendung mit 8 Tropfen VIRCELL DISRUPTER 2 rekonstituieren. In einem Vortex schütteln, bis eine ausreichende Homogenisierung erreicht ist.

PROBENGWINNUNG UND HANDHABUNG:

Zwei typische Kolonien (1-3 mm) der Petrischale auswählen und in 8 Tropfen VIRCELL DISRUPTER 2 erneut suspendieren. In einem Vortexgerät mischen, bis die Suspension vollständig homogenisiert ist.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Alle Reagenzien 1 Stunde vor der Ausführung des Tests entnehmen, damit sie Umgebungstemperatur erreichen. Die Kassette nicht aus der Verpackung nehmen.
2. Die Packung öffnen und Kassette 1 auf einer ebenen Oberfläche anordnen.
3. Die Probe mithilfe eines Vortexgerätes homogenisieren.
4. Mit einer automatischen Mikropipette in jede Mulde 90 µl der Probe abmessen und immer mit dem Test L.GENUS beginnen.
5. Ablesen der Ergebnisse nach 30 Minuten.

 **Späteres Ablesen als nach 30 Minuten kann zu ungenauen Ergebnissen führen.**

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE:

Jede Charge wird vor ihrer Auslieferung einer internen Qualitätskontrolle unterzogen, wobei das Validierungsprotokoll strengste Anforderungen erfüllt. Das Protokoll zu jeder Charge ist auf Anfrage verfügbar. Im Lieferumfang sind positive und negative Kontrollen enthalten, um die korrekte Funktionsweise des Kits in Ihrem Labor zu bestätigen. Für deren Anwendung erfolgt nach der Rekonstitution (siehe „Reagenzienvorbereitung“) deren Untersuchung gemäß dem „Testverfahren“.



INTERPRETATION DER ERGEBNISSE UND TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER:

Um die Ablesung der Ergebnisse durchzuführen und festzustellen, ob die Probe positiv ist, wird eine im Kit enthaltene Intensitätenkarte verwendet. Diese weist vier farbmimetrische Stufen von 0,5 bis 3 auf. Wenn die Intensität der Testlinie unter 0,5 liegt, wird die Probe als negativ angesehen. Sie gilt als positiv, wenn der Streifen größer oder gleich diesem Wert ist.

Wenn in der Probe eine spezifische *Legionella* jedes Konjugats vorhanden ist, erscheinen gefärbte Linien in dem entsprechenden Bereich. Eine Kultur ist positiv, wenn neben der Kontrolllinie, deren Aufgabe es ist, über die Gültigkeit des Assays zu informieren, eine oder mehrere der Testlinien in Erscheinung treten.

Die Interpretation der positiven Ergebnisse wird ausgehend von den folgenden Fotografien ausgeführt und ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:



GATTUNG
POSITIVE
LEGIONELLA

L. PNEUMOPHILA
SEROGRUPPE 1
POSITIVE

L. PNEUMOPHILA
SEROGRUPPEN 2-
15 POSITIVE

NEGATIVE

GATTUNG	SEROGRUPPE 1	SPEZIES (SEROGRUPPEN 1-15)	KL	INTERPRETATION
+	-	-	+	Gattung <i>Legionella</i>
+	+	+	+	<i>Legionella pneumophila</i> Serogruppe 1
+	-	+	+	Spezies <i>Legionella pneumophila</i> (Serogruppen 2-15)
-	-	-	+	Keine <i>Legionella</i>
(*)	(*)	(*)	-	UNGÜLTIGES ERGEBNIS
-	+	+	+	UNGÜLTIGES ERGEBNIS
-	-	+	+	UNGÜLTIGES ERGEBNIS
-	+	-	+	UNGÜLTIGES ERGEBNIS
+	+	-	+	UNGÜLTIGES ERGEBNIS

KL: steht für die Kontrolllinie des Tests

(*): Unabhängig vom Ergebnis

Ungültige Ergebnisse müssen mit einer neuen Bakteriensuspension wiederholt werden. Wenn die Ergebnisse auch nach dem Wiederholungstest ungültig sind, sollte nach der erneuten Isolierung der Kultur ein neuer Test ausgeführt werden; anderenfalls sollte ein anderer Test verwendet werden, um die Kultur zu charakterisieren.

EINSCHRÄNKUNGEN:

1. Dieser Test ist zur Verwendung mit aus humanen respiratorischen Proben oder Umweltproben erhaltene Bakterienkulturen. Er wurde nicht mit anderen Probentypen verifiziert.
2. 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 und die Inkubationszeiten und -temperaturen sind für die Genauigkeit der Ergebnisse essenziell.
3. Der Test wurde nicht zur Identifizierung kompletter Bakterien oder Bakterienbestandteile direkt aus biologischen Proben wie Urin, respiratorischen Sekreten oder Wasser entwickelt und bewertet.
4. Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse unter Berücksichtigung aller klinischen und Labordaten bewertet werden. Die Ergebnisse der Proben sollten immer in Verbindung mit den klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden.
5. Die Testergebnisse sind qualitativer Natur.
6. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse hängt von einer geeigneten Probengewinnung, Transport, Lagerung und Verarbeitungsverfahren ab und kulturen.
7. Ein negatives Ergebnis schließt nicht die Möglichkeit aus, dass ein *Legionella*-Stamm in der Probe vorhanden ist. Das Vorhandensein des Mikroorganismus in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze des Versuchs kann zu einem negativen Ergebnis führen.
8. Obwohl der Test mit einer großen Anzahl isolierter *Legionella*-Kulturen bewertet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige *Legionella*-Stämme antigenische Unterschiede aufweisen, die dazu führen, dass sie auf den Test nicht reagieren.
9. Ein positives Testergebnis schließt die Möglichkeit nicht aus, weitere Pathogene mit der Erkrankung assoziiert sind.

LEISTUNGSDATEN:

• SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT:

Drei Probengruppen wurden analysiert, um die Leistungsmerkmale des Tests zu bewerten: Gruppe I) Bakterienstämme aus Referenzsammlungen (NCTC, DSMZ, ATCC) und 13 nicht-klinische Legionellen; Gruppe II) 141 Kolonien, die aus 64 Wasserproben isoliert wurden, die von einem akkreditierten Wasseranalyselabor für *Legionella*-Tests erhalten wurden; und Gruppe III) eine Gruppe klinischer isolierter Kulturen, die aus 8 *Pseudomonas* sp bestehen, 1 *Acinetobacter* sp, 1 *Staphylococcus aureus*, 1 *Streptococcus viridans*, 1 *Haemophilus* sp und 2 *Streptococcus* sp, von einem spanischen Krankenhaus.

Die Ergebnisse sind wie folgt:

Testlinie	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
<i>Legionella pneumophila</i> Serogruppe 1	97%	>99%
<i>Legionella pneumophila</i> (Serogruppen 1-15)	100%	
Gattung <i>Legionella</i>	100%	



• ANALYTISCHE SENSITIVITÄT:

Mit einer Suspension von *L. pneumophila* Serogruppe 1 (ATCC 33152) McFarland 0,25, 1 Suspension von *L. pneumophila* Serogruppe 5 (ATCC 33216) Mc Farland 0,5 oder einer Suspension von *Legionella longbeachae* (NC11530-02) McFarland 0,25 hat das Kit zu einem positiven Ergebnis geführt.

• INTRA-ASSAY GENAUIGKEIT:

4 Proben (eine positive in der Nähe der Bestimmungsgrenze für jedes Testlinie und eine negative) wurden 5 Mal in einem einzigen Test untersucht, der von demselben Anwender unter denselben Arbeitsbedingungen durchgeführt wurde. In allen Versuchen wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet.

• INTER-ASSAY GENAUIGKEIT:

4 Proben (eine positive in der Nähe der Bestimmungsgrenze für jedes Testlinie und eine negative) wurden einzeln 3 Tage lang nacheinander von zwei verschiedenen Anwendern getestet. In allen Versuchen wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet.

• KREUZREAKTIVITÄT UND INTERFERENZEN:

Die folgenden klinischen isolierten Bakterienkulturen wurden untersucht: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp (8 isolierte Kulturen), *Salmonella* sp, *Proteus mirabilis*, *Xantomonas* sp, *Aeromonas* sp, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* (2 isolierte Kulturen), *Escherichia coli*, *Serratia* sp, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp, *Citrobacter* sp, *Acinetobacter* sp, *Haemophilus* sp, *Streptococcus* sp (2 isolierte Kulturen) und *Streptococcus viridians*, alle Proben stammen von einem spanischen Krankenhaus. Es wurde kein falsch-positives Ergebnis erhalten.

BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLS:

	Für die <i>In vitro</i> Diagnostik
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Bei x-y lagern
	Inhalt ausreichend für n Bestimmungen
	Chargen-Nummer
	Bestell-Nummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	Negatives Ergebnis
	Positives Ergebnis: geringe Intensität
	Positives Ergebnis: hohe Intensität
	Karte für die Interpretation von VIRAPID®

LITERATUR:

1. Barry, S. Fields, Robert F. Benson, and Richard E. Besser. 2002 *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Clin Microbiol Reviews, July 15(3):506-526.
2. Frederick S. Nolte and Christopher A. Conlin. 1986 Major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* carries a species-specific epitope, J Clin Microbiol, Mar, 23(3):643-646.
3. Jamie Bartram, Yves Chartier, John V. Lee, Kathy Pond and Susanne Surman-Lee. World Health Organization 2007 *Legionella* and the prevention of Legionellosis.
4. Jean R. Joly, Roger M. McKinney, John O. Tobin, William F. Bibb, Ian D. Watkins, and Danielle Ramsay. 1986 Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol, April, 23(4):768-771.
5. Min Ja Kim, Jang Wook Sohn, Dae Won Park, Seung Chul Park and Byung Chul chun. 2003 Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' Disease. J Clin Microbiol, July 41(7):2974-2979.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

customerservice@vircell.com

ÜBERPRÜFT: 05/2014

