

GEBRAUCHSINFORMATION - SORGFÄLTIG LESEN !
IN VITRO DIAGNOSTICUM

Katalognummer: 4873171 (100 Tests)

L. pneumophila 1-8 IFT

Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis von Antikörpern gegen Legionella pneumophila:
Polyvalentes Legionella IFT-Testkit Serogruppen 1-8

HINTERGRUND

L.pneumophila wurde 1977 als Erreger der Legionellose (Legionellen Pneumonie oder Legionärskrankheit) identifiziert(1). Die Familie der Legionellaceae umfasst gegenwärtig mehr als 25 Spezies und 33 Serogruppen, wovon mindestens 18 Spezies mit Pneumonie assoziiert sind; diese sind für etwa 1-5% aller Pneumoniefälle verantwortlich (2). L.pneumophila sind pleomorphe, plumpe oder länglich-fusiforme Stäbchenbakterien. Eine Gramfärbung ist nur schwer durchführbar, fällt jedoch negativ aus. Die Antikörperantwort auf L.pneumophila kann spezifisch oder unspezifisch sein, da der Patient möglicherweise Antikörper gegen ähnliche Antigene anderer gram-negativer Bakterien besitzt. Die optimalen Zeitpunkte zur Probenentnahme sind offensichtlich innerhalb der ersten Krankheitswoche oder sobald wie möglich nach Krankheitsbeginn (Akutprobe) und mindestens 3 Wochen nach Krankheitsbeginn (Rekonvaleszentenprobe) (3).Bei der IFA-Methode gilt ein einzelnes Ergebnis von * 1:256 als präsumtiver Nachweis für eine Legionellen-Infektion. Berichten zufolge ist bei bis zu 25% der Patienten kein diagnostischer Titer nachweisbar(4). Die Präzision serologischer Verfahren kann jedoch durch die Verwendung mehrerer Legionellen-spezies (5,6) als Antigenquelle und eines polyvalenten Konjugats, das gegen IgG, IgM und IgA gerichtet ist, maximiert werden

TESTPRINZIP

Antikörper in Humanseren gegen verschiedene Serogruppen von L.pneumophila werden in einem indirekten Test mit FITC-markiertem Anti-Human-Immunglobulin nachgewiesen.

Hitze-inaktivierte Bakterien, die auf Objektträgern fixiert sind, werden mit Patientenserum überschichtet. Vorhandene Antikörper binden an die bakterielle Antigene. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch die Zugabe von FITC-konjugiertem Anti-Human-Immunglobulin sichtbar gemacht. Im positiven Fall zeigt sich eine hellgelb-grünliche Fluoreszenz.

Bei negativem Testergebnis gibt es keine morphologisch für Stäbchenbakterien typische Fluoreszenz.

INHALT DES TESTKITS

- 20 L. pneumophila Objektträger mit je 10 Antigenfeldern: Die Antigenfelder 1-5 eines jeden Objektträgers sind mit inaktivierten Bakterien der Serogruppen 1, 4, 6, 8 und die Antigenfelder 6-10 mit inaktivierten Bakterien der Serogruppen 2, 3, 5 und 7 von L. pneumophila beschichtet. Die Antigene sind Europäischen Ursprungs
- 1 x 1 mL L. pneumophila negatives Kontrollserum (human), lyophilisiert. Als Konservierungsmittel dient Natriumazid (0,1%).

- 1 x 1 mL L. pneumophila positives Kontrollserum (human), lyophilisiert. Als Konservierungsmittel dient Natriumazid (0,1%).
- 2 x 2,5 mL FITC-konjugiertes Anti-Human-Immunglobulin (Ziege), lyophilisiert. Das Konjugat bindet an IgG, IgA und IgM Antikörper. Als Konservierungsmittel dient Natriumazid (0,1%).
- 2 x 20 mL Probenverdünnungspuffer (Ziege), lyophilisiert
- 1 x 3 mL Eindeckmittel
- 2 x 33 mL PBS-Pufferkonzentrat (30x). Als Konservierungsmittel dient Natriumazid (0,1%).

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Feuchte Kammer
- Inkubator, 37 C°
- Deckgläschen 24 x 60 mm
- Fluoreszenzmikroskop

VORSICHTSMAßNAHMEN

- NUR ZUR IN-VITRO DIAGNOSTIK
- Alle Reagenzien vorsichtig mischen und vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen lassen.
- Eine Eintrübung der Reagenzien kann auf eine bakterielle Kontamination hinweisen. Verwenden Sie keine kontaminierten Reagenzien.
- Die Patientenserum und die Kontrollen sollten wie potentiell infektiöses Material behandelt werden. Einmalhandschuhe tragen während der Testdurchführung und dem Umgang mit Patientenserum
- Alle verwendeten Reagenzien als potentiell infektiöses Material entsorgen.
- Entwickler-Puffer und Kontrollen enthalten Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei oder Kupfer aus Rohrleitungen potentiell explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen dieser Lösungen sollte stets mit großen Wassermengen gespült werden, um eine Metallazidbildung in größeren Mengen zu vermeiden.
- In Falle der Aufnahme ist Natriumazid toxisch. In Verbindung mit Säure entstehen toxische Gase. Bei Kontakt mit der Haut mit großen Mengen Wasser abwaschen.

Achtung

Alle aus Humanblut hergestellten Produkte sollten als potentiell infektiös behandelt werden. Das Rohmaterial, zur Herstellung dieses Produktes, zeigte keine Reaktion bei der Untersuchung auf HBsAg, HCV, HIV-1-, und HIV-2-Antikörper mit lizenzierten Reagenzien.

Haltbarkeitsdauer und Lagerung

L. pneumophila IFT nicht nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums verwenden. Der Test sollte gekühlt (2-8°C) für die Dauer der angegebenen Haltbarkeit gelagert werden. Das Mindesthaltbarkeitsdatum befindet sich auf dem Packungsaufkleber.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

- Blutproben aseptisch unter Anwendung standardisierter Blutabnahme-Techniken entnehmen. Die Probe darf keine Antikoagulanzen enthalten, da dies das Testergebnis beeinflussen kann.
- Blutprobe für 10 Minuten bei Raumtemperatur koagulieren lassen.
- 10 Minuten bei 1000xg zentrifugieren.
- Serum vorsichtig absaugen und in einen fest verschliessbaren, sterilen Behälter füllen.
- Das Serum kann sofort getestet, bei 2-8°C bis zu 3 Tage gelagert oder zur Konservierung eingefroren werden. Nicht in einem No-Frost Gefrierschrank lagern.

HERSTELLUNG DER REAGENZIEN

- PBS-Pufferkonzentrat mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen.
- Probenpuffer mit 20 mL PBS auflösen.
- Anti-Human-Immunglobulin-Konjugat mit 2,5 mL Probenpuffer unter vorsichtigem Schütteln lösen.
- Positives und negatives Kontrollserum mit je 1 mL Probenpuffer unter vorsichtigem Schütteln lösen. Die Seren liegen dann in einer gebrauchsfertigen Verdünnung vor (nicht weiterverdünnen).
- Rekonstituierte Kontrollseren und Konjugate sind bei 2-8°C 6 Wochen haltbar. Aufgelöstes PBS ist bei Raumtemperatur 6 Wochen haltbar. Der rekonstituierte Probenpuffer ist bei 2-8°C 6 Wochen haltbar. Eindeckmittel gut verschlossen und kühl aufbewahren.

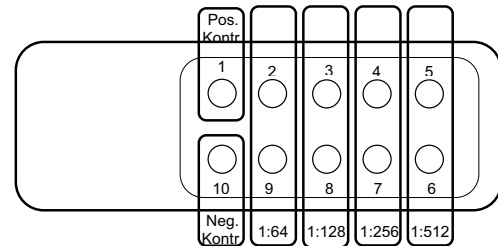
TESTDURCHFÜHRUNG

- Benötigte Anzahl Objektträger aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur erwärmen. Folie an der vorgesehenen Stelle öffnen, Objektträger herausnehmen und das Mattfeld beschriften.
- Die Patientenseren werden mit Probenpuffer auf 1:32 (310 µL Probenpuffer + 10 µL Serum) vorverdünnt. Anschließend bis zum Screeningtiter 1:128 mit PBS weiterverdünnen.
- Die aufgelösten Kontrollseren bzw. vorverdünnten Patientenseren werden auf die Antigenfelder aufgetragen (1 Tropfen bzw. 15 µL).

Folgendes Schema wird zur Titration empfohlen:

Antigenfeld 1: positives Kontrollserum

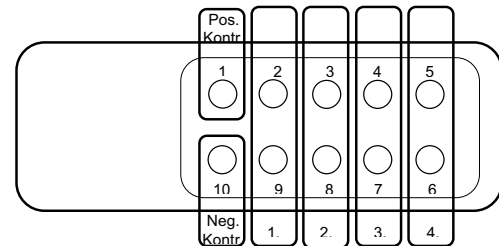
Antigenfeld 10: negatives Kontrollserum
 Antigenfeld 2 + 9: Patientenserum 1 :64
 Antigenfeld 3 + 8: Patientenserum 1 :128
 Antigenfeld 4 + 7: Patientenserum 1 :256
 Antigenfeld 5 + 6: Patientenserum 1 :512



Patientenserum

Folgendes Schema wird zum Screening empfohlen:

Antigenfeld 1: positives Kontrollserum
 Antigenfeld 10: negatives Kontrollserum
 Antigenfeld 2 + 9: 1. Patientenserum 1 :128
 Antigenfeld 3 + 8: 2. Patientenserum 1 :128
 Antigenfeld 4 + 7: 3. Patientenserum 1 :128
 Antigenfeld 5 + 6: 4. Patientenserum 1 :128



- Objektträger in die feuchte Kammer legen, 30 min bei 37°C inkubieren.
- Die Objektträger aus der Kammer nehmen, kurz mit PBS spülen, 2 x 5 min in frisch angesetzte PBS stellen, kurz mit Aqua dest. spülen. Das Wasser gut abschlagen, die Maske trockenwischen. **Die Antigenfelder dürfen nicht antrocknen.**
- Die Objektträger in die feuchte Kammer legen und FITC-konjugiertes Anti-Human-Immunglobulin auf die Antigenfelder tropfen (15 µL/Feld), 30 min bei 37°C inkubieren.
- Die Objektträger aus der Kammer nehmen, kurz mit PBS spülen, 2 x 5 min in frisch angesetzte PBS stellen, kurz mit Aqua dest. spülen.
- Objektträger mit Eindeckmittel sofort überschichten und Deckglas luftblasenfrei auflegen.
- Ergebnisse mit dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Ist die Ablesung nicht sofort möglich, können die Präparate dunkel bei 4°C bis zu 24 Stunden gelagert werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Vor der Verwendung alle Komponenten visuell auf Anzeichen einer bakteriellen Kontamination, Gefrierspuren und Undichtigkeiten hin untersuchen. Bei jedem Versuchsansatz sollten sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen enthalten sein. Die Negativkontrolle muss negativ reagieren und die Positivkontrolle muss eine positive Reaktion zeigen. Es wird empfohlen, die Ergebnisse in einem entsprechendem Ordner zu dokumentieren um die Testergebnisse überwachen zu können. Falls die Ergebnisse nicht mit den vorhandenen Werten übereinstimmen kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Distributor oder aber die Firma Meridian.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Positives Kontrollserum:

Antigenfeld 1: etwa 50% der Bakterien zeigen starke Fluoreszenz (4+).

Negatives Kontrollserum:

Stäbchen sind gar nicht oder nur sehr matt, jedoch nicht leuchtend zu erkennen.

Patientenserum:

Eine positive Reaktion sollte austitriert werden. Humane Seren können sowohl mit Pool I und/oder Pool II reagieren. Kreuzreaktionen mit unterschiedlichen Serogruppen sind eher die Regel als die Ausnahme. Die vorliegenden Poolantigene I und II sind somit zum Screening und zum Ausschluss von negativen Seren geeignet.

Seren mit einem Titer von $\geq 1:128$ sind als positive Reaktion zu werten. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen entsprechende Richtlinien beachtet werden.

LEISTUNGSDATEN

Vergleich des IFTs mit einem Referenz-ELISA

ELISA (Kombiniert IgG+IgM)				
		POS	NEG	Total
	POS	19	10	29
IFA	NEG	0	13	13
	Total	19	23	42

Übereinstimmung (IFT gegen Referenz-ELISA):

Übereinstimmung der positiven Werte: $19/19 \times 100\% = 100\%$

Übereinstimmung der negativen Werte: $13/23 \times 100\% = 56.5\%$

Korrelation mit der klinischen Diagnose (für 17/42 Patienten, war die klinische Diagnose bekannt):

	IFA	ELISA
Nicht-Infiziert (Total 9)	Neg	Neg
Infiziert (8)		
Patient 1 Tag 1	P (1:256)	P(IgG + IgM)
Patient 1 Tag 7	P (1:1024)	P(IgG + IgM)
Patient 2 Tag 1	P (1:128)	P(IgG)
Patient 2 Tag 35	P (1:256)	Fragwürdig (IgG)
Patient 3 Tag 1	P (1:4096)	P(IgG + IgM)
Patient 3 Tag 7	P (1:4096)	P(IgG + IgM)
Patient 3 Tag 61	P (1:4096)	P(IgG + IgM)
Patient 4 Tag 1	P (1:2048)	P(IgM)
Patient 5 Tag 1	P (1:128)	Neg
Patient 6 Tag 1	P (1:2048)	P(IgG + IgM)
Patient 7 Tag 1	P (1:512)	Neg
Patient 7 Tag 4	P (1:2048)	P(IgM)
Patient 8 Tag 1	P (1:128)	P(IgM)
Patient 8 Tag 6	P (1:256)	P(IgM)
Patient 8 Tag 20	P (1:256)	P(IgM)
Patient 8 Tag 27	P (1:256)	P(IgM)
Patient 8 Tag 39	P (1:128)	P(IgM)

**REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA/
BIBLIOGRAFIA**

1. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR, and the Laboratory Investigation Team: Legionnaires' Disease Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 297:1197-1203, 1977.
2. Tilton RC, Balows A, Hohnadel DC, and Reiss RF, Editors: Lower respiratory tract specimens. *IN Clinical Laboratory Medicine*, Mosby Year Book, Inc., St. Louis, MO. pp591-603, 1992.
3. Wilkinson HW: Manual of Clinical Immunology-Second Edition: Immune Response to *Legionella pneumophila*. Rose NR, Friedman H, editors. pp 500-503 (1980). Published by Am Society for Microbiology, Washington, DC
4. Harrison TG, Taylor AG: Timing of seroconversion in legionnaires' Disease. *Lancet* (2):795, 1988
5. Wilkinson HW, Reingold AL, Brake BJ, McGiboney DL, Gorman GW, Broome CV: Reactivity of serum from patients with suspected Legionellosis against 29 antigens of legionellaceae and Legionella-like organisms by indirect immunofluorescent assay. *J Infect Dis* 147:23-31, 1983
6. McIntyre M, Kurtz JB, Selkon JB: Prevalence of antibodies to 15 antigens of legionellaceae in patients with community-acquired pneumonia. *Epidemiol Infect* 104:39-45, 1990
7. Wilkinson HW, Farshy CE, Fikes BJ, Cruce DD, Yealy LP: Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *L. pneumophila* and inhibition of titers against non-specific, gram-negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescent test for legionellosis. *J Clin Microbiol* 10:685-689, 1979

**Key guide to symbols/Guida ai simboli/Guide des symboles
Erläuterung der graphischen symbole / Guía de símbolos**



Expiry date / Date de péremption/ Scadenza/
Fecha de caducidad/ Haltbarkeitsdatum



Lot number / Numéro de lot / Numero di lotto/
Número de lote / Chargenbezeichnung



For in vitro diagnostic use / Usage in vitro/
Per uso diagnostico in vitro / Uso diagnóstico
in vitro / In vitro Diagnosticum



This product fulfills the requirements of
Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic
medical devices / Ce produit répond aux
exigences de la Directive 98/79 CE relative
aux dispositifs médicaux de diagnostic
in vitro/ Questo prodotto soddisfa i requisiti della
Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-
diagnostici in vitro/ Este producto cumple con
las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre
los productos sanitarios para diagnóstico in
vitro/ Dieses Produkt entspricht den
Anforderungen der Richtlinie über In Vitro
Diagnostica 98/79/EG



Catalogue number / Référence article/Codice
dell'articolo/ Número de catálogo /
Artikelnummer



Please read pack insert / Lire attentivement
le mode d'emploi / Leggere il foglietto
informativo/ Leer instrucciones de uso / Bitte
Packungsbeilage beachten



Manufactured by / Fabriqué par/ Prodotto da
/ Fabricado por / Hergestellt von



Contains sufficient for <n> tests / Contenu
suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente
per "n" prove/ Contenido suficiente para <n>
ensayos / Enthält genügendes für <n> Tests



Conservare a/ Store at / Conserver entre/
Conservar a/ Lagerung bei



Positive control/Positive Kontrolle/Control
positivo
Controllo positivo/Contrôle positif



Negative control/Negative Kontrolle/Control
negativo/Controllo negativo/Contrôle
négatif



Conjugate/Conjugué / Conjugado /
Konjugat / Conjugato



Sample Diluent /

Diluent pour échantillons / Diluente de
Muestra / Probediluens / Diluente per
campioni

The manufacturer is:

Meridian Bioscience Europe s.r.l.

Via dell'Industria 7
20020 Villa Cortese
I – Milano
ITALY

Tel.: +39 (03 31) 43 36 36
Fax.: +39 (03 31) 43 36 16
e-mail: info@mdeur.com

Meridian Bioscience Europe sa/nv

Rue de l'Industrie 7
B - 1400 Nivelles
BELGIUM

Tel.: +32 (67) 89 59 59
Fax.: +32 (67) 89 59 58
e-mail: info@mdeur.be

Meridian Bioscience Europe France

Le Quadra
455 Promenade des Anglais
F - Nice Cedex 3
FRANCE

Tel.: +33 (4) 93 18 72 10
Fax.: +33 (4) 93 18 72 11
e-mail: info@meridianbioscience.fr

Meridian Bioscience Europe bv

Halderheiweg 6
NL - 5282 SN Boxtel
THE NETHERLANDS

Tel.: +31 (411) 62 11 66
Fax.: +31 (411) 62 48 41
e-mail: meridian@wxs.nl

Rev:02/04

