

## RIDA® GENE Legionella

**REF** PG8005



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Legionella ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. aus humaner bronchoalveolärer Lavage.

Die RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch *Legionella* verursachten Pneumonie unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die Gattung der Legionellen gehört zur Familie der *Legionellaceae* und wird in über 40 Spezies mit mehr als 70 Serogruppen unterteilt. Legionellen sind fakultative, intrazelluläre gram negative Bakterien und haben ihren Infektionspeak in den Sommer- und frühen Herbstmonaten. Legionellenerkrankungen werden zwischen ambulant-erworbenen Infektionen, reisebedingten Infektionen und nosokomialen Infektionen unterschieden. In den USA liegt die Mortalitätsrate nosokomialer Infektionen zwischen 15 - 20 %.<sup>1,2</sup> In Europa verlaufen 12 % aller Legionellen-Infektionen tödlich. Unter der großen Anzahl an *Legionellen*-Spezies sind zwei wichtige humanpathogene Spezies. Eine Infektion mit *L. pneumophila* führt hauptsächlich zur Legionärskrankheit (auch Legionellose genannt) und *L. longbeachae* verursacht Pontiac-Fieber. Pontiac-Fieber ist eine akute, selbst-limitierende Influenza-ähnliche Erkrankung, jedoch ohne das Auftreten einer Lungenentzündung. Ungefähr 7 % der mit Legionellen infizierten Patienten entwickeln das Pontiac-Fieber.<sup>3</sup>

*L. pneumophila* hat 16 Serogruppen und 70 % der *Legionellen*-Infektionen in Europa werden durch *L. pneumophila* Serogruppe 1 verursacht. Andere Spezies die zu einer *Legionellen*-Infektion führen sind unter anderem *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* und *L. longbeachae*.<sup>4</sup>

Die Legionärskrankheit ist eine akute respiratorische Infektion die in 90 % der Fälle durch *L. pneumophila* verursacht wird. Diese Erkrankung wurde 1976 in Philadelphia während einer Tagung der Amerikanischen Legion das erste Mal beschrieben. Dadurch erhielt die Legionärskrankheit seinen Namen. Zwei weitere Legionellose-Ausbrüche mit insgesamt 6 Toten wurden 2013 in Brisbane, Australien und Reynoldsburg, Ohio gemeldet. Die Symptome sind Fieber, Husten (trocken oder sputum-produzierend) und Schüttelfrost. Andere, weniger häufig vorkommende Symptome sind Diarrhoe, Erbrechen, Bradykardie und Hyponatriämie.<sup>3</sup>

Menschen in jedem Alter können sich mit *Legionellen* infizieren, aber ältere Menschen, sowie Raucher und Patienten mit chronischer Lungenerkrankung sind vermehrt anfällig für solch eine Infektion. Selbst in Ländern mit effektivem Gesundheitssystem werden 90 % der Fälle von Legionärskrankheit nicht diagnostiziert, da die klinische Präsentation sehr breit gefächert ist und die Erkrankung selten auftritt. Außerdem ist es schwer, die Legionärskrankheit nur durch Symptome oder radiologische Untersuchungen von anderen Pneumonien zu

unterscheiden, so dass andere sensitive und spezifische Methoden, wie die real-time PCR, einen großen Vorteil für die Diagnose von *Legionellen*-Infektionen mit sich bringt.

### 3. Testprinzip

RIDA®GENE Legionella ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* aus humaner bronchoalveolärer Lavage. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* (16S-rRNA) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Legionella Test enthält eine **Internal Control DNA** (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

### 4. Packungsinhalt

**Tab. 1:** Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 15 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:

**Tab. 2:** Benötigtes Zubehör (kompatibel)

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden**

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und LightCycler® 480z
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 -20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-freies Wasser)

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA-Präparation aus bronchoalveolärer Lavage

Für die DNA-Präparation aus bronchoalveolärer Lavage wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE Legionella Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und nicht direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen

je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, das **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

**Tab. 4:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

## 9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

**Negativkontrolle:** Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

**Proben:** Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 DNA real-time PCR Profil

**Tab. 5:** DNA real-time PCR Profil für LightCycler® Serie, Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Tab. 6:** DNA real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

### 9.3.2 Universal real-time PCR Profil

**Hinweis:** Das Universal real-time PCR Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

**Tab. 7:** Universal real-time PCR Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Tab. 8:** Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	<i>Legionella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Legionella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	540/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	540/610	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Legionella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none</b>
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>Legionella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Legionella</i> spp.	FAM	
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Legionella</i> spp.	Green	<b>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein</b>
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Red	

## 10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2).

Die **Positive Control** für *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

**Tab. 10:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	IAC Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

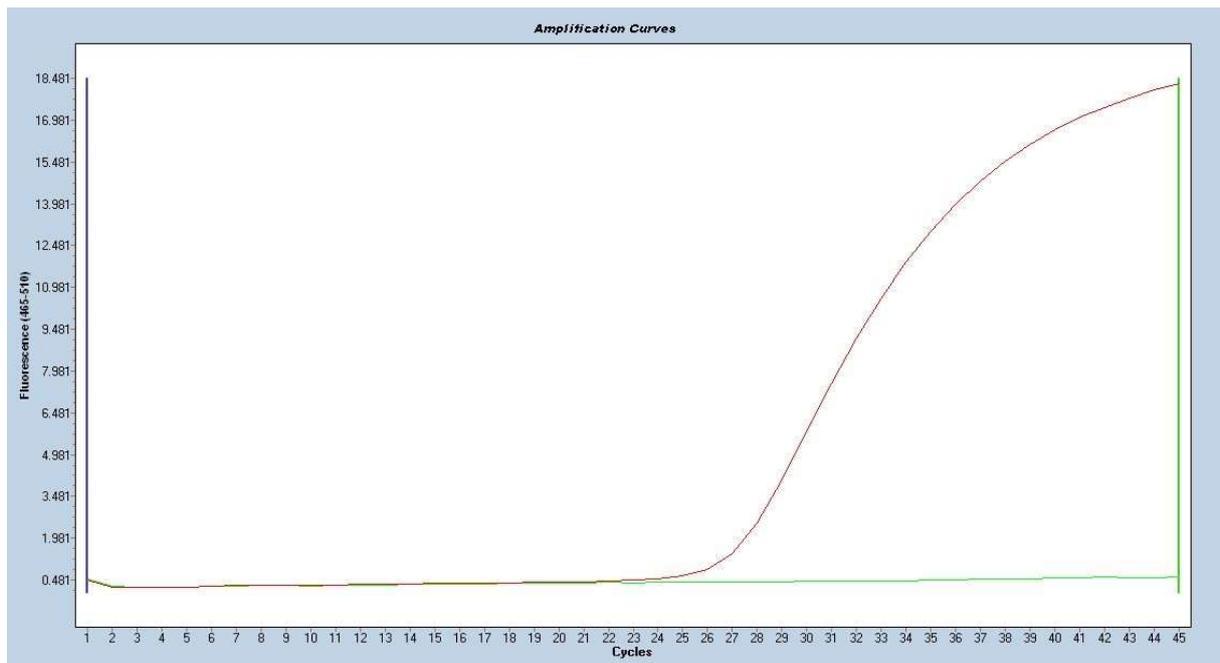
\*1 Ein Ct-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

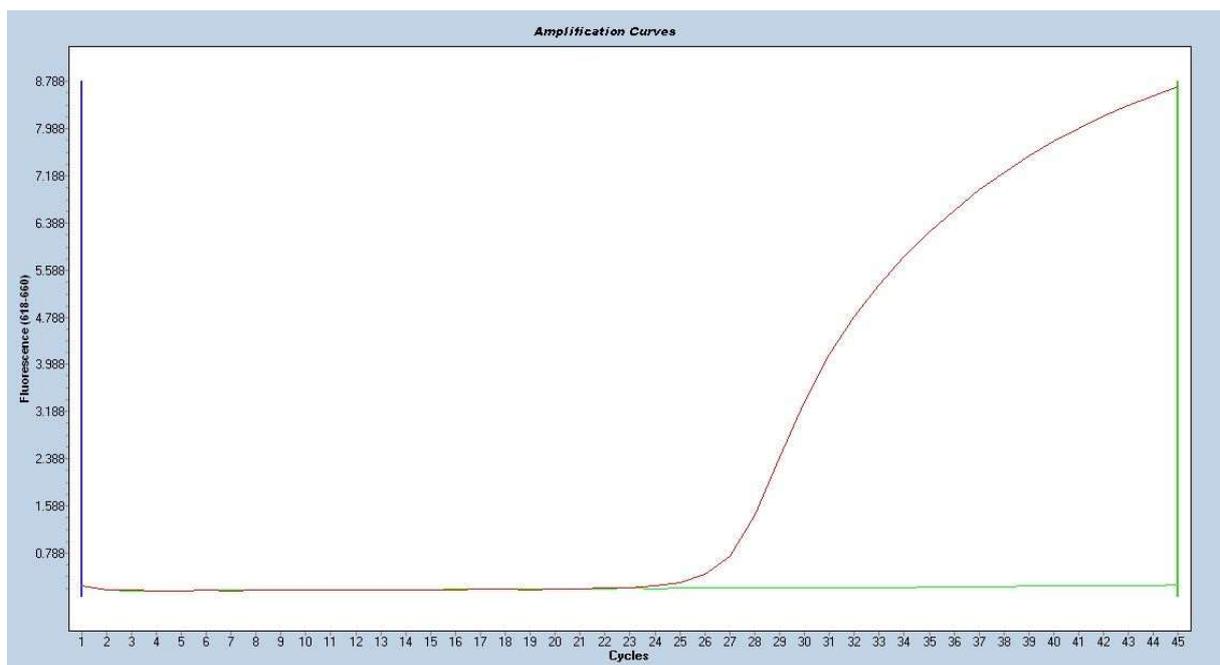
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Legionella* spp.) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*L. pneumophila*) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

**Tab. 11:** Probenauswertung

Zielgene		ICD	Ergebnis
<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>		
positiv	negativ	positiv/negativ	<i>Legionella</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	positiv/negativ	Ungültig
positiv	positiv	positiv/negativ	<i>L. pneumophila</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	Zielgene sind nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	Ungültig

*Legionella* ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

*Legionella* ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle führen können.

*Legionella* ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

## 12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für humane bronchoalveolärer Lavage validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Legionella zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (16S-rRNA) vorhanden sind.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 282 extrahierte respiratorische Proben mit dem RIDA®GENE Legionella Test und einer in-house real-time PCR in einem Institut in Deutschland untersucht (s. Tab 12, Tab.13). Die Extraktion erfolgte auf dem MagNa Pure 96. Die anschließende real-time PCR erfolgte auf dem LightCycler® 480II.

**Tab. 12:** Korrelation der *Legionella pneumophila*-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Legionella real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Legionella	Positiv	51	0	51	Pos. Übereinstimmung: 100 %
	Negativ	0	231	231	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	51	231	282	

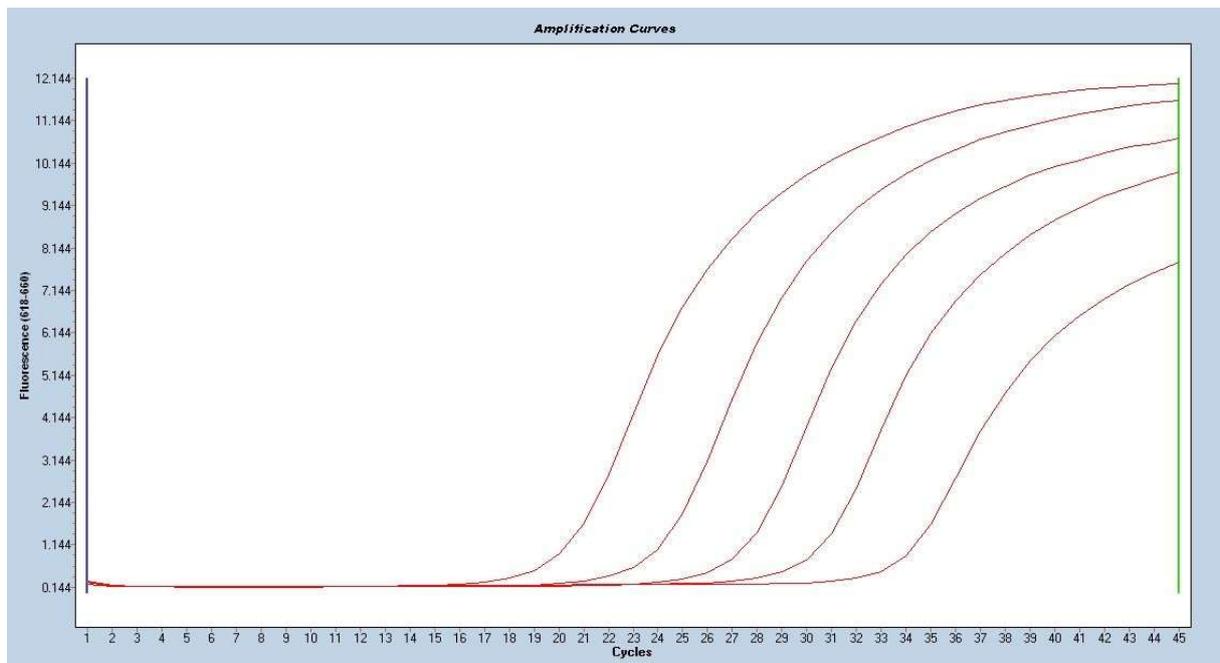
**Tab. 13:** Korrelation der *Legionella* spp.-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Legionella real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Legionella	Positiv	70	0	70	Pos. Übereinstimmung: 100 %
	Negativ	0	212	212	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	70	212	282	

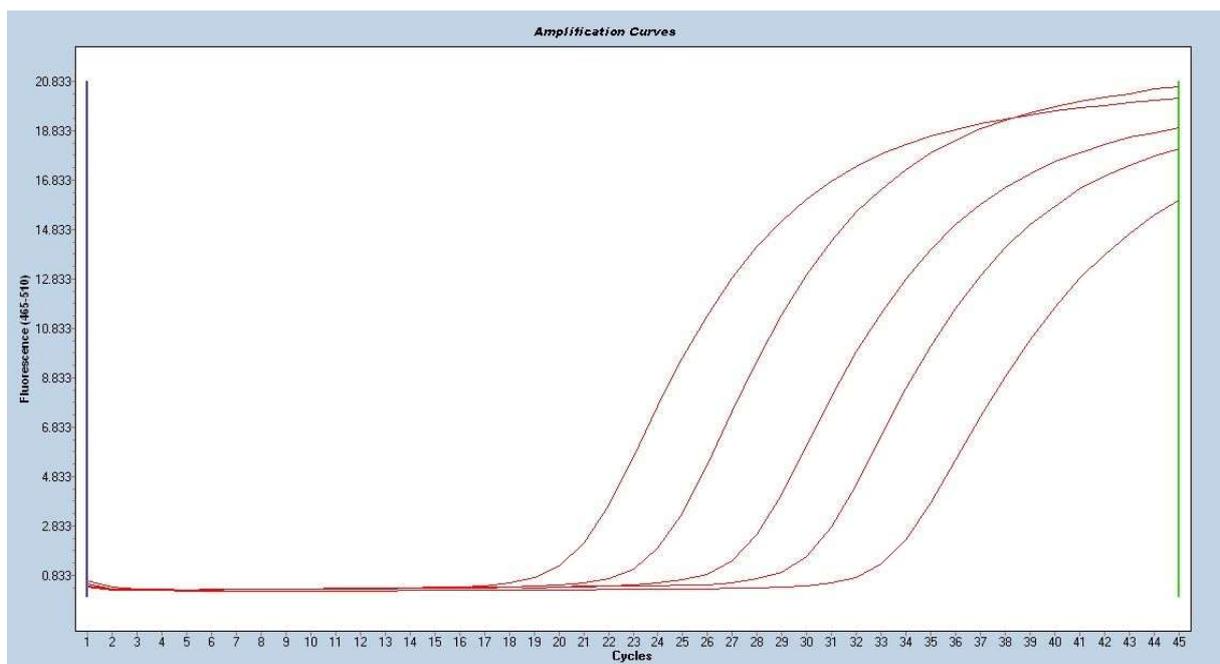
### 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Legionella multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien / Reaktion.

Die folgenden Abbildungen 3 und 4 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Abb. 3:** Verdünnungsreihe *Legionella* spp. ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Abb. 4:** Verdünnungsreihe *L. pneumophila* ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, DNA-Extraktion und DNA-Gehalt.

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* aus humaner bronchoalveolärer Lavage. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s.Tab.14):

**Tab. 14:** Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	Coxsackie virus B4, human	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Parainfluenza virus, serotype 3	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	Echovirus 11	-	Metapneumovirus, human	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Enterovirus Typ 71	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	Herpes simplex virus 1, strain McIntyre	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Rhinovirus Genogruppe A, human	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	Herpes simplex virus 2, strain MS	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Influenza virus A (PR/8/34)	-	Parainfluenza virus 1, human, strain C35	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
Coronavirus 229E, human	-	Influenza virus B (B/Lee/40)	-	Parainfluenza virus 2, human, strain Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-

### 13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen Legionellen-Stämmen untersucht (s. Tab. 15). Alle Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Legionella multiplex real-time PCR nachgewiesen.

**Tab. 15:** Analytische Reaktivitätstestung

<b>Stamm</b>	<b>Serogruppe</b>	<b>Legionella spp.</b>	<b>Legionella pneumophila</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	1	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	2	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	3	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	4	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	5	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	6	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	7	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	8	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	9	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	10	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	11	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	12	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	13	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella pneumophila</i>	14	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>Legionella anisa</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella dumoffi</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella cardiaca</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella feeleeii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella gormanii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella hackeliae</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella jordanis</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella longbeachae</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella maceachernii</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella micdadei</i>	-	<b>positiv</b>	negativ
<i>Legionella oakridgensis</i>	-	<b>positiv</b>	negativ

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-07-30	Vorversion
2020-10-02	Generelle Überarbeitung 13.1 Klinische Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Literatur

1. Howden BP *et al.* Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484–488.
2. Benin AL *et al.* An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237–243.
3. Bartram *et al.* Legionella and the prevention of Legionellosis .2012, World Health Organisation (WHO).
4. Joseph C *et al.* Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311–320.