

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Legionella pneumophila IgM ELISA

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM class antibodies against Legionella pneumophila in human serum or plasma



DELEGM0650



96 wells

1. INTRODUCTION

Legionellae are aerobic gram-negative facultative intracellular parasites of certain protozoa. They are found in freshwater environments worldwide and can cause respiratory disease (legionellosis) in humans. Legionella was first identified after an outbreak of pneumonia involving delegates of the 1976 American Legion Convention at a Philadelphia hotel. The genus Legionella currently has at least 50 species comprising 70 distinct serogroups. One species of Legionella, *L. pneumophila*, is the aetiological agent of approximately 90 % of legionellosis cases, and serogroup 1 (Sg1) accounts for about 84 % of these cases. *L. pneumophila* multiplies itself at temperatures between 25 and 42 °C, with an optimal growth temperature of 35 °C. Legionella thrives in warm, stagnant water in the environment and in artificial systems such as cooling towers, evaporative condensers, hot and cold water systems and spa pools that mimic the natural environment in which the organism thrives. These systems also provide the means by which aerosols/droplets are generated and the organism dispersed into the atmosphere. Legionellosis can be acquired by the inhalation of aerosols containing Legionella bacteria or by micro-aspiration of ingested water contaminated with Legionella. Person-to-person transmission is not thought to be a risk. The likelihood of contracting Legionnaires' disease depends on the level of contamination in the water source, the susceptibility of the person exposed, and the intensity of exposure. Legionnaires' disease is characterized as an "opportunistic" disease that attacks individuals who have an underlying illness or a weakened immune system. Predisposing risks include increasing age, being male, heavy smoking, alcohol abuse, chronic lung disease, immunosuppressive therapy, cancer chemotherapy, organ or bone marrow transplant, and corticosteroid therapy. Legionellosis can appear in two distinct clinical presentations: Legionella pneumonia (Legionnaires' disease) with an incubation period of approx. 2-10 days (may extend up to 16-20 days) and Pontiac fever (incubation period: normally 12-48 hours). Legionella pneumonia (Legionnaires' disease) is a serious form of pneumonia that carries with it a case-fatality ratio of 10-15 %. Legionnaires' disease patients initially present with cough, fever and nonspecific symptoms including malaise, myalgia and headache. Some patients develop shaking chills, chest pain, diarrhea, delirium or other neurologic symptoms. Extra pulmonary involvement is rare. Pontiac fever is a milder form of the disease without manifestations of pneumonia and presents as an influenza-like illness. Symptoms may include headache, chills, muscle aches, a dry cough and fever. It is usually self-limiting and typically does not require treatment. The attack rate is much higher than for Legionnaires' disease (up to 95 % of those exposed).

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
Legionella pneumophila	Legionella pneumonia (Legionnaires' disease)	Cough, fever and nonspecific symptoms (malaise, myalgia, headache). Some patients develop shaking chills, chest pain, diarrhea, delirium or other neurologic symptoms.	Inhalation of aerosols containing Legionella bacteria or micro-aspiration of ingested water contaminated with Legionella
	Pontiac fever	Influenza-like illness (headache, chills, muscle aches, a dry cough and fever) without manifestations of pneumonia	

The presence of pathogen or infection may be identified by

- Culture
- Urinary antigen detection
- PCR
- Serology: Detection of antibodies by IF, ELISA

2. INTENDED USE

The Legionella pneumophila IgM ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Legionella pneumophila in human serum or plasma (citrate, heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **SORB MT Legionella pneumophila Coated Microplate (IgM):** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with Legionella pneumophila antigens; in resealable aluminium foil.
- **SAM DIL IgM Sample Diluent:** 1 bottle containing 100 ml of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; anti-human IgG (RF Absorbent); coloured green; ready to use; white cap.
- **STOP SOLN Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **WASH SOLN 20x Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **ENZ CONJ Legionella pneumophila anti-IgM Conjugate:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled antibody to human IgM in phosphate buffer (10 mM); coloured red; ready to use; black cap.
- **SUB TMB TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap; < 5% NMP.
- **CAL C Legionella pneumophila IgM Positive Control:** 1 vial containing 2 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; red cap.
- **CAL B Legionella pneumophila IgM Cut-off Control:** 1 vial containing 3 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; green cap.
- **CAL A Legionella pneumophila IgM Negative Control:** 1 vial containing 2 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; blue cap.

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2-8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20-25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Coated Microplate

The break-apart snap-off strips are coated with Legionella pneumophila antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2-8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 ml Washing Buffer + 190 ml distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20-25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37°C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2-8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. For CSF please use the instruction for use ABVL0001. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2-8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three to five and the volume of Washing Buffer from 300 µl to 350 µl to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µl standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µl Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20-25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20-25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA microwell plate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA microwell plate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the-plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.1.1. Results in Units [U]

$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{U}]$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ U (Units)}$

9.2. Interpretation of Results

Cut-off	10 U	-
Positive	> 11 U	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 U	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 U	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
<p>Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.</p> <p>In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.</p>		

9.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications. For further information about the specific performance characteristics please contact Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.461	4.23
#2	24	1.003	2.12
#3	24	0.862	2.65

Interassay	n	Mean (U)	CV (%)
#1	12	21.35	5.10
#2	12	15.46	7.62
#3	12	4.22	11.86

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 95.65% (95% confidence interval: 85.16% - 99.47%).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100.0% (95% confidence interval: 66.37% - 100.0%).

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.5 mg/ml bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameters did not reveal significant evidence of false-positive results due to cross-reactions.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1. EINLEITUNG

Legionellen sind aerobe, gram-negative, fakultativ intrazelluläre Parasiten bestimmter Protozoen. Sie sind weltweit in Süßwasser anzutreffen und können beim Menschen respiratorische Erkrankungen (Legionellose) hervorrufen. Legionella (L.) pneumophila wurde zum ersten Mal nach einem Ausbruch von Lungenentzündung bei einem Treffen der US-Kriegsveteranenvereinigung „American Legion State Convention“, das 1976 in einem Hotel in Philadelphia stattfand, identifiziert. Das Genus Legionella umfasst aktuell mindestens 50 Spezies, die aus 70 verschiedenen Serogruppen bestehen. L. pneumophila ist der Erreger von etwa 90 % der Legionellose-Fälle, wobei Serogruppe 1 für etwa 84 % der Fälle verantwortlich ist. L. pneumophila vermehrt sich bei Temperaturen zwischen 25 und 42 °C; die optimale Wachstumstemperatur beträgt 35 °C. Legionella gedeiht in warmem, stehendem Wasser, sowohl in der Umwelt, als auch in künstlichen Systemen wie Kühltürmen, Verdunstungskondensatoren, Kalt- und Warmwassersystemen und Spa-Pools, die die natürliche Umgebung des Organismus nachahmen. Durch diese Systeme kann es auch zur Bildung von Aerosolen/Tropfchen kommen, über die der Organismus fein verteilt in die Luft abgegeben wird. Eine Legionellose kann durch die Inhalation von Aerosolen oder durch Mikroaspiration von kontaminiertem Wasser erworben werden. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch gilt als unwahrscheinlich. Die Wahrscheinlichkeit an der Legionärskrankheit zu erkranken, ist abhängig vom Grad der Kontamination der Wasserquelle, der Empfänglichkeit der exponierten Person und der Expositionsintensität. Die Legionella Pneumonie ist eine "opportunistische" Krankheit, die Individuen mit einer bereits bestehenden Grunderkrankung oder mit einem geschwächten Immunsystem befällt. Prädisponierende Faktoren sind z. B. ein hohes Alter, exzessiver Nikotin- und Alkoholmissbrauch, chronische Lungenerkrankungen, immunsuppressive Therapie, zytostatische Behandlungen, Organ- oder Knochenmarkstransplantationen und Corticosteroid-Therapie. Männer erkranken häufiger als Frauen. Die Legionellose kann zwei unterschiedliche klinische Erscheinungsformen annehmen: die Legionella Pneumonie (Legionärskrankheit) mit einer Inkubationszeit von etwa 2-10 Tagen (bis zu 16-20 Tage) und das Pontiac-Fieber (Inkubationszeit gewöhnlich 12-48 Stunden). Die Legionärskrankheit ist eine schwere Form der Lungenentzündung mit einer Todesfallrate von 10-15 %. Die Erkrankung beginnt mit Husten, Fieber und unspezifischen Symptomen wie Unwohlsein sowie Muskel- und Kopfschmerzen. Bei einigen Patienten treten Schüttelfrost, Schmerzen in der Brust, Durchfall, Delirium oder andere neurologische Symptome auf. Extrapulmonale Entzündungen sind selten. Das Pontiac-Fieber ist eine leichtere Form der Erkrankung ohne Pneumonie mit leichten grippalen Symptomen wie Kopf- und Muskelschmerzen, Frösteln, trockenem Husten und Fieber. Die Krankheit ist gewöhnlich selbst-limitierend und erfordert keine Behandlung. Die Erkrankungsrate ist sehr viel höher als bei der Legionärskrankheit (bis zu 95 % der exponierten Personen).

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
Legionella pneumophila	Legionella Pneumonie (Legionärskrankheit) Pontiac-Fieber	Husten, Fieber und unspezifische Symptome (Unwohlsein, Muskel- und Kopfschmerzen); teilweise Schüttelfrost, Brustschmerzen, Durchfall, neurologische Symptome; Influenza-ähnlich ohne Pneumonie: Kopf- und Muskelschmerzen, Frösteln, trockener Husten und Fieber	mit Legionellen belastetes Wasser (Inhalation von Aerosolen oder Mikroaspiration)

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Antigennachweis im Urin
- Kultur
- PCR
- Serologie: Nachweis spezifischer Antikörper mittels IF, ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der Legionella pneumophila IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Legionella pneumophila in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **SORB MT Legionella pneumophila beschichtete Mikrotiterplatte (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Legionella pneumophila, Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **SAM DIL IgM-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 ml Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; anti-human IgG (RF- Absorbens); grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **STOP SOLN Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0,2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **WASH SOLN 20x Waschpuffer (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe.
- **ENZ CONJ Legionella pneumophila anti-IgM Konjugat:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM in Phosphatpuffer (10 mM); rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **SUB TMB TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe; < 5% NMP.
- **CAL C Legionella pneumophila IgM Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **CAL B Legionella pneumophila IgM Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **CAL A Legionella pneumophila IgM Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37°C
- Manuelle oder automatische Waschorruchtung
- Mikropipetten (10 - 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2-8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2-8 °C gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1. Beschichtete Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit Legionella pneumophila Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2-8 °C lagern.

6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 ml Waschpuffer + 190 ml destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20-25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2-8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Für Liquor ist die Arbeitsanleitung ABVL0001 zu verwenden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2-8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70- -20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z. B. 10 µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µl Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µl Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **0,200** und < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off Kontrolle + 0,42 OD Cut-off Kontrolle = 0,86 : 2 = 0,43

Cut-off = 0,43

9.2.1. Ergebnisse in Einheiten [U]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Einheiten} = \text{U}]$

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ U}$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 U	-
Positiv	> 11 U	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 U	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als negativ .
Negativ	< 9 U	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.
Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.		

9.3.1. Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
IgM	Typisch für Primärantwort Hoher IgM-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgG-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion Selten: → persistierendes IgM
IgG	Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion

10. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	24	0,461	4,23
#2	24	1,003	2,12
#3	24	0,862	2,65

Interassay	n	Mittelwert (U)	Vk (%)
#1	12	21,35	5,10
#2	12	15,46	7,62
#3	12	4,22	11,86

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 95,65% (95% Konfidenzintervall: 85,16% - 99,47%).

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 100,0% (95% Konfidenzintervall: 66,37% - 100,0%).

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,5 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.5. Kreuzreaktivität

Die Untersuchung eines Probenpanels mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter ließ keine signifikanten Anzeichen von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von Kreuzreaktivitäten erkennen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

1. INTRODUZIONE

Legionellae sono parassiti facoltativamente intracellulari di alcuni protozoi aerobi gram-negativi. Essi si trovano a livello mondiale in ambienti di acqua dolce e possono causare malattie respiratorie (legionellosi) nell'uomo. La Legionella è stata identificata per la prima volta dopo un'epidemia di pneumonia che involveva delegati della 1976 American Legion Convention in un albergo in Philadelphia.

Al genere Legionella appartengono attualmente almeno 50 specie con 70 sierogruppi distinti. Una specie di Legionella, *L. pneumophila*, è l'agente etiologico di circa 90 % dei casi di legionellosi e il sierotipo 1 (Sg1) è responsabile per circa 84 % di questi casi. *L. pneumophila* si moltiplica ad una temperatura tra 25 e 42°C, con un ottimo della temperatura di crescita a 35°C. Legionella cresce in acqua stagnante e calda, sia in ambienti naturali che artificiali, come torri di refrigeranti, condensatori ad evaporazione, sistemi di acqua calda e fredda e terme che imitano ambienti naturali nei quali l'organismo prospera. Questi sistemi forniscono aerosoli/goccioline, attraverso i quali l'organismo si disperde nell'atmosfera. La legionellosi può essere acquisita tramite inalazione di aerosol contenenti batteri di Legionella o tramite micro-aspirazione di acqua ingerita contaminata con Legionella. Si pensa che una trasmissione uomo ad uomo non sia un rischio. La probabilità di contrarre la malattia Legionellosi dipende dal livello di contaminazione nella fonte acquosa, dalla suscettibilità della persona esposta e dall'intensità dell'esposizione. La malattia della Legionellosi è caratterizzata come una malattia "opportunistica" che attacca individui che hanno una malattia di fondo o un sistema immunitario debole. Rischi che predispongono alla manifestazione della malattia sono un'età avanzata, l'essere maschile, un forte abuso di nicotina, l'abuso di alcool, una malattia cronica polmonare, una terapia immunosoppressiva, una chemioterapia, il trapianto di organi o ossa e una terapia con corticosteroidi.

La Legionellosi può apparire sotto forma di due distinti quadri clinici: Legionella pneumonia (malattia di Legionellosi) con un periodo d'incubazione di circa 2-10 giorni (può estendersi fino a 16-20 giorni) e la febbre di Pontiac (periodo d'incubazione: normalmente 12-48 ore). La Legionella pneumonia (malattia Legionellosi) è una forma seria della pneumonia con un elevato tasso di mortalità del 10-15 %. Pazienti con la Legionellosi presentano inizialmente tosse, febbre e sintomi non-specifici che includono malessere, mialgia e mal di testa. Alcuni pazienti sviluppano convulsioni febbrili, dolore al petto, diarrea, delirio o altri sintomi neurologici. Un interessamento extra-polmonare è raro. La febbre di Pontiac è una forma più mite della malattia senza la manifestazione di pneumonia e presenta una sintomatologia simile all'influenza. I sintomi possono includere mal di testa, convulsioni, dolore muscolare, una tosse secca e febbre. La malattia è usualmente auto-limitante e non richiede trattamenti. Il tasso è molto più alto rispetto alla Legionellosi (fino a 95 % degli esposti).

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
Legionella pneumophila	Legionella pneumonia (Legionellosi)	Tosse, febbre, sintomi non specifici (malessere, miaglia, mal di testa). Alcuni pazienti sviluppano convulsioni febbrili, dolore al petto, diarrea, delirio o altri sintomi neurologici.	Inalazione di aerosol contenente batteri di legionella o micro-aspirazione di acqua ingerita contaminata con Legionella
	Febbre di Pontiac	Malattia simile all'influenza (mal di testa, convulsioni, dolore muscolare, tosse secca e febbre) senza manifestazione di pneumonia	

La presenza di agenti patogeni o infezione può essere identificato mediante:

- Coltura
- Determinazione antigenica nelle urine
- PCR
- Sierologia: determinazione di anticorpi con IF, ELISA

2. USO PREVISTO

Il Legionella pneumophila IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per Legionella pneumophila nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay). Micropiastre sono rivestiti con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un lettore di micropiastre ELISA.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **SORB MT Legionella pneumophila (IgM) micropiastre rivestita:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con Legionella pneumophila antigeni; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **SAM DIL Tampone diluente IgM:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH $7,2 \pm 0,2$; anti-umane IgG (mezzo di assorbimento RF); colore verde; pronto all'uso; tappo bianco.
- **STOP SOLN Soluzione bloccante:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **WASH SOLN 20x Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH $7,2 \pm 0,2$; tappo bianco.
- **ENZ CONJ Coniugato Legionella pneumophila anti IgM:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi anti-IgM umani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **SUB TMB Soluzione Substrato TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo; < 5% NMP.
- **CAL C Controllo positivo Legionella pneumophila IgM:** 1 flacone da 2 ml controllo (siero o plasma umano); colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **CAL B Controllo cut-off Legionella pneumophila IgM:** 1 flacone da 3 ml controllo (siero o plasma umano); colore giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **CAL A Controllo negativo Legionella pneumophila IgM:** 1 flacone da 2 ml controllo (siero o plasma umano); colore giallo; tappo blu; pronto all'uso.

Per le sostanze potenziali pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

4.2. Accessori forniti

- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37°C
- Lavatore, manuale o automatico, di micropiastre
- Micropipette per l'uso tra 10-1000 µl
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2-8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2-8 °C.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20-25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

6.1. Micropiastre rivestita

Le strisce divisibile sono rivestiti con l'antigeni della Legionella pneumophila. Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2-8 °C.

6.2. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Diluire il Tampone di lavaggio 1+19; per esempio 10 ml del Tampone di lavaggio + 190 ml di acqua distillata. Il campione di tampone diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20-25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

6.3. Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2-8 °C, al riparo dalla luce. La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrate, eparina) umano. Per il CSF, si prega di utilizzare le istruzioni per l'uso ABVL0001. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70- -20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone IgM e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del Tampone di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 ± 1 °C.

1. Pipettare 100 µl di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo.
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi!
5. Pipettare 100 µl di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente (20-25 °C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20-25 °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µl di Soluzione bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della Soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo avviene.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione bloccante.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre ELISA **a zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < **0,100**
- **Controllo negativo:** Valore di assorbanza < **0,200 e < Cut-off**
- **Controllo cut-off:** Valore di assorbanza **0,150 – 1,300**
- **Controllo positivo:** Valore di assorbanza > **Cut-off**

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo cut-off 0,42 = 0,86/2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1. Risultati in unità [U]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità} = \text{U}]$

Esempio: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ U}$

9.3. Interpretazione dei risultati

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).
Zona grigia	9 – 11 U	Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. Se il risultato è nuovamente nella zona grigia, il campione viene giudicato come negativo .
Negativo	< 9 U	Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile.
<p>La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.</p>		

9.3.1. Isotipi degli anticorpi e Stato dell'infezione

Sierologia	Significato
IgM	Caratteristica della risposta primaria dell'anticorpo Alto titolo IgM con basso titolo IgG: → suggerisce una infezione molto recente o acuta Raro: → IgM persistente
IgG	Caratteristica della risposta secondaria dell'anticorpo Può persistere per diversi anni Alto titolo IgG con basso titolo IgM: → può indicare un'infezione passata

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite. Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	0,461	4,23
#2	24	1,003	2,12
#3	24	0,862	2,65

Interdosaggio	n	Media (U)	CV (%)
#1	12	21,35	5,10
#2	12	15,46	7,62
#3	12	4,22	11,86

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analita specifici. La specificità diagnostica è 95,65% (95% intervallo di confidenza: 85,16% - 99,47%).

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifici. La sensibilità diagnostica è 100,0% (95% intervallo di confidenza: 66,37% - 100,0%).

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici et itterici contenenti fino a 10 mg/ml di emoglobina, 5 mg/ml di trigliceridi e 0,5 mg/ml di bilirubina non hanno presentato fenomeni d'interferenza nel presente test.

10.5. Reattività crociata

L'investigazione di un gruppo di campioni con attività di anticorpi contro parametri potenzialmente interferenti non ha rivelato alcuna evidenza rilevante di risultati falsamente positivi dovuto a reattività crociata.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione incrociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

1. INTRODUCCIÓN

Legionellae son bacterias aerobias Gram-negativas y parásitos intracelulares facultativos de ciertos protozoos. Viven en ambientes de agua dulce en todo el mundo y pueden causar enfermedad respiratoria (legionelosis) en humanos. La bacteria Legionella se identificó por primera vez después de un brote de neumonía que afectó a los participantes de una convención de la Legión Americana en un hotel de Philadelphia en 1976. El género Legionella actualmente incluye al menos 50 especies que abarcan 70 serogrupos distintos. Una de las especies de Legionella, *L. pneumophila*, es el agente etiológico de aproximadamente el 90% de los casos de legionelosis, y el serogrupo 1 (sg1) representa en torno al 84 % de estos casos. La bacteria *L. pneumophila* se reproduce a temperaturas de entre 25 y 42 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 35 °C. Legionella se multiplica rápidamente en aguas calientes y estancadas en el medio ambiente y en sistemas artificiales como torres de refrigeración, condensadores evaporativos, sistemas de abastecimiento de agua caliente y fría y en piscinas de hidroterapia que imitan el ambiente natural en el que estas bacterias se reproducen. Estos sistemas también favorecen la dispersión de bacterias en la atmósfera debida a la formación de aerosoles/goteos. La legionelosis puede tener su origen en la inhalación de aerosoles que contengan la bacteria Legionella o por microaspiración de agua ingerida contaminada con Legionella. No se transmite de persona a persona. La probabilidad de contraer la enfermedad del legionario depende del nivel de contaminación de la fuente de agua, de la susceptibilidad de la persona expuesta y de la intensidad de la exposición. La legionelosis se caracteriza por ser una enfermedad "oportunist" que ataca a individuos enfermos o inmunodeficientes. Riesgos de predisposición a la enfermedad incluyen edad avanzada, ser varón, abuso del tabaco o del alcohol, enfermedades pulmonares crónicas, terapia inmunosupresora, quimioterapia, transplante de órganos o médula ósea y terapia con corticoesteroides. La Legionelosis puede darse de dos formas: la enfermedad del legionario, con un periodo de incubación de aproximadamente 2-10 días (puede extenderse hasta los 16-20 días) y la fiebre de Pontiac (periodo de incubación: normalmente de 12-48 horas). La enfermedad del legionario es una forma grave de neumonía con un porcentaje de mortalidad del 10-15 %. Los pacientes que sufren esta enfermedad presentan inicialmente tos, fiebre y síntomas inespecíficos que incluyen malestar, mialgia y dolor de cabeza. Algunos pacientes padecen escalofríos, dolor en el pecho, diarrea, delirios u otros síntomas neurológicos. La infección extrapulmonar es poco frecuente. La fiebre de Pontiac es una forma leve de la enfermedad sin manifestación de neumonía y se presenta con síntomas parecidos a la gripe. Éstos pueden incluir dolor de cabeza, escalofríos, dolor muscular, una tos seca y fiebre. Normalmente remite espontáneamente y en la mayor parte de los casos no requiere tratamiento. El riesgo de padecer la enfermedad tras exposición es mucho mayor que en la enfermedad del legionario (hasta el 95 % de las personas expuestas contraen la enfermedad).

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
Legionella pneumophila	Enfermedad del legionario	Tos, fiebre y síntomas inespecíficos (malestar, mialgia, dolor de cabeza). Algunos pacientes sufren escalofríos, dolor en el pecho, diarrea, delirios u otros síntomas neurológicos.	Inhalación de aerosoles que contengan la bacteria Legionella o por microaspiración de agua ingerida contaminada con Legionella.
	Fiebre de Pontiac	Enfermedad parecida a la gripe (dolor de cabeza, escalofríos, dolor muscular, tos seca y fiebre) sin manifestación de neumonía.	

Detección de infecciones o de agentes patógenos de:

- Cultivo
- Detección de antígenos en la orina
- PCR
- Serología: Detección de anticuerpos por IF, ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático Legionella pneumophila IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Legionella pneumophila en suero o plasma (citrito, heparina) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las microplacas están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un lector de microplacas ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **SORB MT Legionella pneumophila (IgM) microplaca recubierta:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Legionella pneumophila, en bolsa de aluminio.
- **SAM DIL Diluyente para IgM de la muestra:** 1 botella de 100 ml de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; anti-humana IgG (RF Absorbente); color verde; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **STOP SOLN Solución de parada:** 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0,2 mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **WASH SOLN 20x Tampón de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 ml de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca.
- **ENZ CONJ Conjugado Legionella pneumophila anti-IgM:** 1 botella de 20 ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **SUB TMB Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla; < 5% NMP.
- **CAL C Control positivo Legionella pneumophila IgM:** 1 botella de 2 ml control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **CAL B Control cut-off Legionella pneumophila IgM:** 1 botella de 3 ml control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado.
- **CAL A Control negativo Legionella pneumophila IgM:** 1 botella de 2 ml control (suero o plasma humano); color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de microplaca con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas para uso de (10-1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2-8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2-8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar Todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20-25 °C) y mezclarlos antes de serem utilizados!

6.1. Microplaca recubierta

As tiras rompibles están recubiertas con antígeno de Legionella pneumophila. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita di dióxido de silicio y almacenar a 2-8 °C.

6.2. Tampón de lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de lavado 1+19; por ejemplo. 10 ml de la Tampón de lavado + 190 ml de agua destilada. La muestra de tampón diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20-25 °C). Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3. Solución de sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2-8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrate, heparina) humano. Las instrucciones de uso ABVL0001 deben ser usadas para LCR. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2-8°C, en caso contrario deben ser alicotadas y almacenadas congeladas (-70- -20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p. e.: 10 µl de la muestra con 1 ml de tampón IgM, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de de 3 a 5 veces y el volumen de Tampón de lavado de 300 µl a 350 µl para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipetear 100 µl de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h \pm 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la Tampón de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µl de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20-25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µl de la Solución de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con la Solución de sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Ajustar el lector de microplaca (fotómetro) Elisa **al cero** utilizando **el Blanco**.

Si por razones técnicas el lector de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la esquema de la placa.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < **0,100**
- **Control negativo:** valor de la extinción < **0,200** y < **Cut-off**
- **Control cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control positivo:** valor de la extinción > **Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de lo Control cut-off.

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control cut-off} + 0,44 \text{ OD Control cut-off} = 0,86:2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados en unidades [U]

Promedio valor de la extinción de la muestra x 10 = [unidades = U]
Cut-off

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ U}$

9.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa .
Negativo	< 9 U	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

9.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

Serología	Significado
IgM	Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda Raras: → persistente IgM
IgG	Característica de la respuesta secundario del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en lo grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas. Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0,461	4,23
#2	24	1,003	2,12
#3	24	0,862	2,65

Inter ensayo	n	Promedio (U)	CV (%)
#1	12	21,35	5,10
#2	12	15,46	7,62
#3	12	4,22	11,86

10.2. Especificad Diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 95,65% (95% Intervalo de confianza: 85,16% - 99,47%).

10.3. Sensibilidad de Diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 100,0% (95% Intervalo de confianza: 66,37% - 100,0%).

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos, de 0,5 mg/ml para bilirrubina y de 10 mg/ml hemoglobina.

10.5. Reactividad cruzada

La investigación del panel de muestras con actividad de los anticuerpos en los parámetros con potencial de reacción cruzada no reveló ninguna evidencia significativa de resultados positivos falsos debido a reacciones cruzadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación está sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligrosos.

**13. BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA
BIBLIOGRAFIA**

- Bartram, Jamie; Chartier, Yves; Lee, John V.; Pond, Kathy; Surman-Lee, Susanne (Eds.) (2007): Legionella and the prevention of legionellosis. Geneva: WHO (14).
- Darby, Jonathan; Busing, Kirsty (2008): Could it be Legionella? In *Australian Family Physician* 37 (10), pp. 812–815.
- Fields, Barry S.; Benson, Robert F.; Besser, Richard E. (2002): Legionella and Legionnaires' Disease. 25 Years of Investigation. In *Clinical Microbiology Reviews* 15 (3), pp. 506–526. DOI: 10.1128/CMR.15.3.506-526.2002.
- Joseph, C. A. (2004): Legionnaires' disease in Europe 2000-2002. In *Epidemiology and infection* 132 (3), pp. 417–424. DOI: 10.1017/S0950268804002018.
- Marrie, Thomas J.; Hoffman, Paul (2006): Legionellosis. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 374–380.
- Robert Koch Institut (RKI) (2013): Legionellose. In *RKI-Ratgeber für Ärzte*.
- Steinert, Michael; Hentschel, Ute; Hacker, Jörg (2002): Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. In *FEMS microbiology reviews* 26 (2), pp. 149–162.
- Stout, Janet E.; Yu, Victor L. (1997): Legionellosis. In *The New England Journal of Medicine* 337 (10), pp. 682–687. DOI: 10.1056/NEJM199709043371006.
- Yu, Victor L.; Plouffe, Joseph F.; Pastoris, Maddalena Castellani; Stout, Janet E.; Schousboe, Mona; Widmer, Andreas et al. (2002): Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. In *The Journal of Infectious Diseases* 186 (1), pp. 127–128. DOI: 10.1086/341087.
- Zuravleff, Jeffrey J.; Yu, Victor L.; Shonnard, John W.; Davis, Bridgett K.; Rihs, John D. (1983): Diagnosis of Legionnaires' disease. An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. In *JAMA* 250 (15), pp. 1981–1985.

**14. ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES
/ ABREVIATURAS**

NMP	N-Methyl-2-pyrrolidone
------------	------------------------

15. SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA / RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TESTE

SCHEME OF THE ASSAY
Legionella pneumophila IgM ELISA












Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µl	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µl	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 °C Wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer					
TMB Substrate solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark					
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore