



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)


[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

**RIDA<sup>®</sup> GENE Legionella**  
real-time PCR

Art. Nr.: PG8005  
100 Reaktionen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 -20 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Verwendungszweck

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

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

## 2. Erläuterung

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, reisebedingte 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 an Legionellen erkrankten Patienten entwickelt das Pontiac-Fieber.<sup>3</sup>

*L. pneumophila* hat 16 Serogruppen und 70% der *Legionellen*-Infektionen in Europa werde 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 real-time multiplex PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. aus humanem Trachealsekret, Sputum und bronchalveolärer Lavage. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Legionella pneumophila* und *Legionella* spp. (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 1100 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x 11 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x 1800 µl	orange
N	PCR Water	1x 500 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 5 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 Geräte und Materialien

- Der RIDA® GENE Legionella real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:
    - Extraktionsplattformen:
      - RIDA® Xtract (R-Biopharm)
      - Maxwell®16 (Promega)
      - Magna Pure 96 (Roche)
    - Real-time PCR-Gerät:
      - Roche: LightCycler® 480II
      - Agilent Technologies: Mx3005P
      - Applied Biosystems: ABI 7500
      - Abbott: m2000rt
      - Bio-Rad: CFX96™
      - Cepheid: SmartCycler®
      - QIAGEN: Rotor-Gene Q
- Bemerkung: 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 I (PG0001) bei Verwendung des LightCycler® 480
- 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

## 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 Test 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 Material Safety Data Sheets (MSDS) unter [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation aus Trachealksekret, Sputum oder bronchoalveolarer Lavage wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell<sup>®</sup> 16 (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA<sup>®</sup>GENE Legionella Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die Internal Control RNA (ICD) nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 3).

Wird die Internal Control DNA (ICD) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD 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 Negativ- und 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 Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 2, Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, das **PCR Water** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 2: 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	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20,0 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab. 3: 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	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	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 PCR Water zum vorgelegten Master-Mix als Negativkontrolle pipettieren.

*Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der ICD als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der ICD 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 ICD als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und die Inhibitionskontrolle je 1 µl der ICD 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. 4, Tab. 5).

### 9.3 Geräteeinstellungen

Tab. 4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 480II, SmartCycler® und 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

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

**Hinweis:** Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die „Man. Grenzw. Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 und 4 auf 5.0 eingestellt werden. In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Man. Grenzw. Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

Tab. 5: Real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI Serie, m2000rt und 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

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

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	<i>Legionella</i> spp.	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICD	533/580	
	<i>Legionella pneumophila</i>	618/660	
Cepheid SmartCycler®	<i>Legionella</i> spp.	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 und 4 auf 5.0 ein
	ICD	Kanal 2	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Kanal 4	
ABI 7500	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Abbott m2000rt	<i>Legionella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Legionella</i> spp.	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Legionella</i> spp.	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Red	
Bio-Rad CFX96™	<i>Legionella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	

\*In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

## 10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7, Abb. 1, Abb. 2).

Die Positivkontrolle 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. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
PTC	Positiv	NA * <sup>1</sup>	Siehe QAC
NTC	Negativ	Ct > 20	0

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

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

Wenn die Negativkontrolle (NTC) nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Negativkontrolle 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 Positiv- und Negativkontrolle (*Legionella spp.*) auf dem LightCycler® 480II

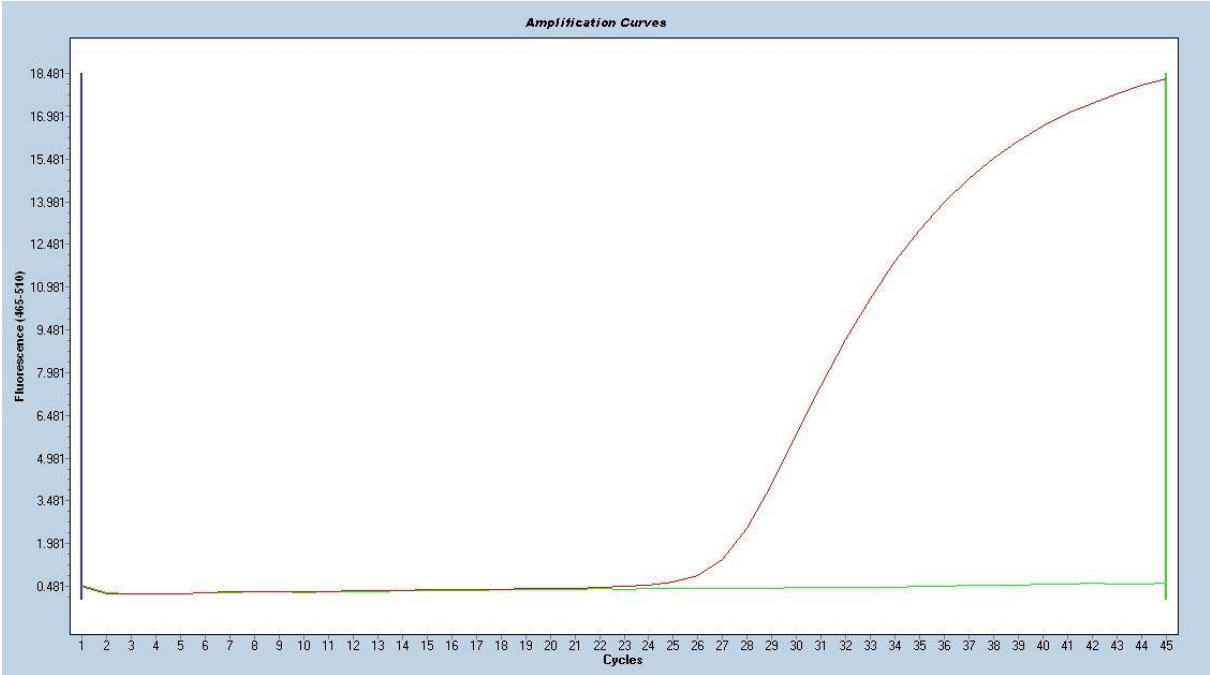
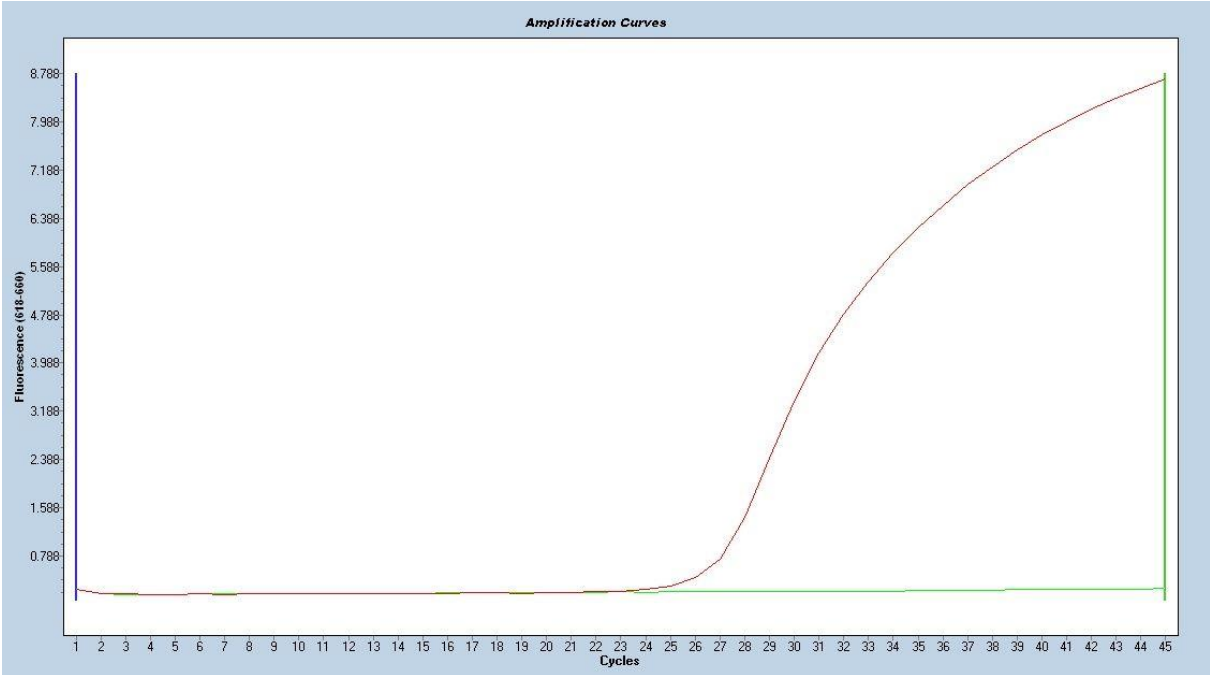


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (*L. pneumophila*) auf dem LightCycler® 480II



## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Probenauswertung

Zielgene			
Legionella spp	<i>L. pneumophila</i>	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	positiv/negativ	Legionella spp. nachweisbar
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 (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Legionella ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA (ICD) 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 (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) 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 humanes Trachealsekret, bronchoalveolare Lavage und Sputum 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 Sondenbindungsregion 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.

## 13. Testmerkmale

### 13.1 Klinisches Leistungsmerkmal

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 118 klinische Proben mit dem RIDA®GENE Legionella Test und einer in-house real-time PCR in einem Institut in Deutschland untersucht.

Tab. 9: Korrelation der Legionella Ergebnisse mit der RIDA®GENE Legionella real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR		Insgesamt	
		Positiv	Negativ		
RIDA®GENE Legionella	Positiv	18	0	18	Positive Übereinstimmung: 100%
	Negativ	0	100	100	Negative Übereinstimmung: 100%
Insgesamt		18	100	118	



### 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Legionella real-time multiplex PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien / Reaktion (s. Abb. 3, Abb. 4). Für die Nutzung auf dem SmartCycler® gilt eine Nachweisgrenze von  $\geq 500$  DNA-Kopien/Reaktion.

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

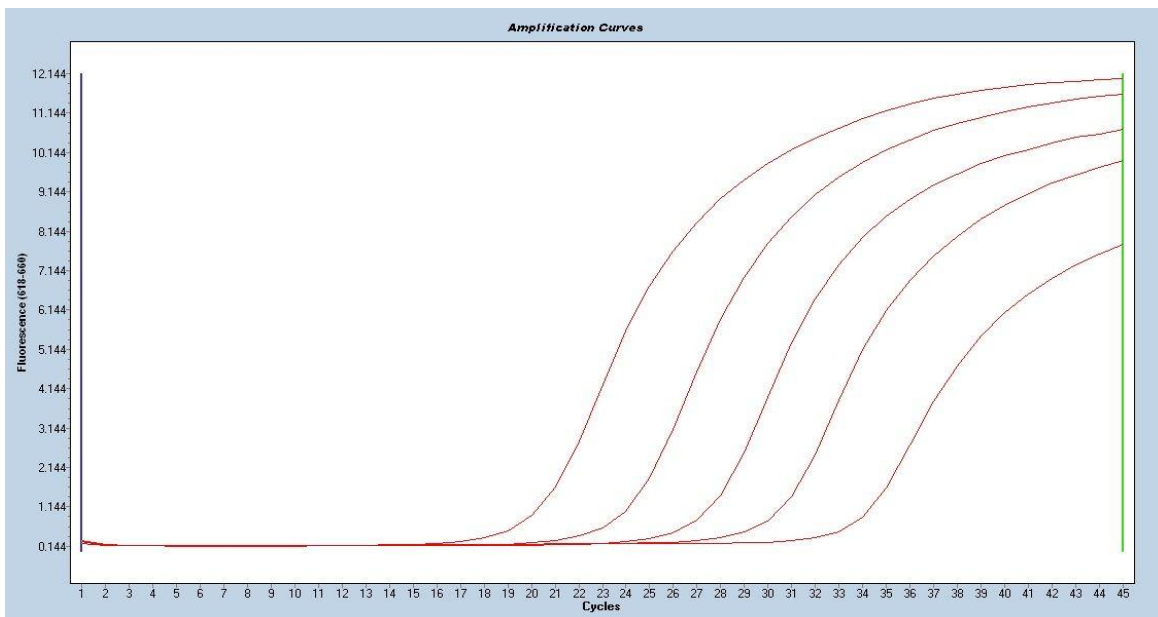
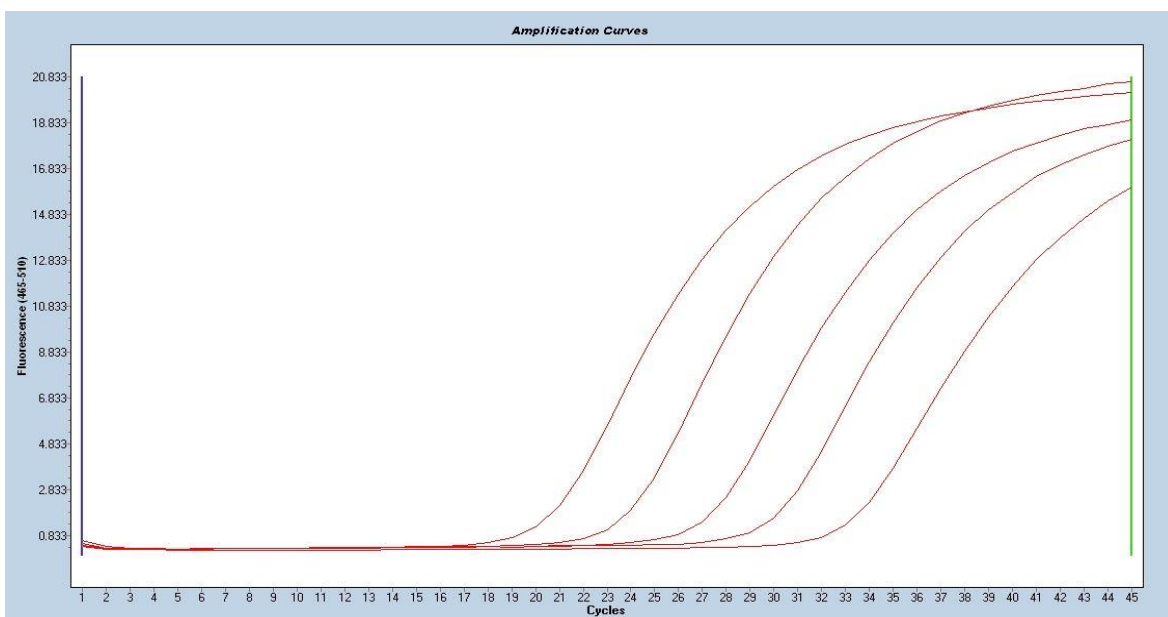


Abb. 4: Verdünnungsreihe *L. pneumophila* ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II



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

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Legionella real-time multiplex PCR ist spezifisch für *L. pneumophila* und *Legionella* spp. aus humanem Trachealsekret, Sputum und BAL. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10):

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Human parainfluenza virus 4b strain CH19503	-	Mycoplasma pneumoniae Strain FH of Eaton Agent	-
Adenovirus 7, Human, Strain Gomen	-	Human Coronavirus 229E	-	Human Parainfluenza Virus serotype 3	-	Neisseria meningitidis Strain FAM18	-
Bordetella parapertussis Strain 12822	-	Human Metapneumovirus	-	Human respiratory syncytial virus strain Long	-	Streptococcus pneumoniae strain NCTC 7465	-
Bordetella pertussis Tohama 1	-	Human Coxsackie B4	-	Human respiratory syncytial virus strain 9320	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	
Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Human Cytomegalovirus	-	Human Rhinovirus Genogruppe A	-		
Haemophilus influenzae Rd	-	Human parainfluenza virus 1 strain C35	-	Influenza virus infectious A/PR/8/34	-		
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Human parainfluenza virus 2 strain Greer	-	Klebsiella pneumoniae strain MGH78578	-		
<i>Acinetobacter baumannii</i> Strain 5377	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. Lari	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Adenovirus	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Adenovirus 40, Human, Strain Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. novobiosepticus R22	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Rotavirus	-		
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-		
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-		
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-		
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. Fetus	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-		

### 13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA® GENE Legionella real-time PCR wurde mit verschiedenen Legionellen-Stämmen untersucht (s. Tab. 11). Alle Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA® GENE Legionella real-time PCR nachgewiesen.

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung

Stamm	Serogruppe	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	1	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	2	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	3	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	4	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	5	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	6	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	7	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	8	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	9	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	10	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	12	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	13	positiv	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	14	positiv	positiv
<i>Legionella bozemanii</i>	-	positiv	negativ
<i>Legionella longbeachae</i>	-	positiv	negativ
<i>Legionella micdadei</i>	-	positiv	negativ
<i>Legionella dumoffii</i>	-	positiv	negativ
<i>Legionella gromanii</i>	-	positiv	negativ

## 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.