

# MutaPLEX®

## *Legionella species*

### real time PCR kit

***Test für den qualitativen in-vitro-Nachweis von Legionella-species-DNA in klinischen Proben und Umweltproben (z. B. Wasserproben)***

***Test for the qualitative in vitro detection of Legionella species DNA in clinical specimens and environmental samples (e. g. water samples)***

Gültig ab / Valid from 2017-02-09



**KG191932  
KG191996**



32/96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1</b>	<b>VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>TESTPRINZIP</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>2</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT</b>	<b>3</b>
<b>7</b>	<b>WICHTIGE HINWEISE</b>	<b>3</b>
<b>8</b>	<b>ALLGEMEINE HINWEISE</b>	<b>3</b>
<b>9</b>	<b>PROBENMATERIAL</b>	<b>4</b>
<b>10</b>	<b>PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>11</b>	<b>KONTROLL-DNA</b>	<b>4</b>
	<i>DNA-Isolation aus klinischen und Umweltproben</i>	<i>5</i>
<b>12</b>	<b>REAL-TIME-PCR</b>	<b>5</b>
	12.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	<i>5</i>
	12.2 <i>Durchführung</i>	<i>5</i>
	12.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	<i>7</i>
<b>13</b>	<b>INTERPRETATION DER ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>14</b>	<b>VALIDIERUNGSDATEN</b>	<b>9</b>
<b>15</b>	<b>EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>16</b>	<b>PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>10</b>
<b>17</b>	<b>LEISTUNGSDATEN</b>	<b>12</b>
	17.1 <i>Diagnostische Sensitivität und Spezifität</i>	<i>12</i>
	17.2 <i>Analytische Sensitivität</i>	<i>12</i>
	17.3 <i>Analytische Spezifität</i>	<i>13</i>
<b>18</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>14</b>
<b>19.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>15</b>

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kit dient dem Nachweis von *Legionella-species*-DNA in klinischen (z. B. Rachen- oder Nasenabstriche, Bronchiallavagenproben) und Umweltproben (z. B. Wasserproben) mittels Real-time-PCR in offenen Real-time-PCR-Systemen.

## 2 EINLEITUNG

Legionellen sind weit verbreitete Umweltkeime, die in natürlichen, aber auch künstlichen wasserführenden Systemen vorkommen. Temperaturen zwischen 30°C und 50°C und das Vorhandensein von Protozoen begünstigen ihre Vermehrung, da Legionellen die Fähigkeit besitzen, sich intrazellulär in Amöben und anderen Einzellern zu vermehren. Aus ihrem natürlichen Lebensraum gelangen Legionellen gelegentlich in vom Menschen geschaffene künstliche Biotope. Es lässt sich nicht vermeiden, dass Legionellen über die öffentlichen Wasserversorgungsnetze in Warmwassersysteme von Wohnhäusern, Krankenhäusern und Hotels mit umfangreichen Rohrsystemen eingespeist werden, sich dort stark vermehren und so für Menschen zu einer Gefahr werden. Zusätzlich zu den Warmwassersystemen in Gebäuden sind insbesondere Rückkühlwerke von Klimaanlage („Cooling Towers“), Whirlpools und aerosolproduzierende Luftbefeuchter als bedeutende Infektionsquellen durch Legionellen zu nennen.

Die Übertragung der Legionellen erfolgt durch die Inhalation oder Mikroaspiration erregerrhaltiger lungengängiger Aerosole. Durch Aerosole eingeatmet, gelangen Legionellen in die humanen Alveolarmakrophagen, wo sie sich replizieren und unter Schädigung des Lungenepithels und Lungensurfactants atypische Pneumonien hervorrufen. Haupterreger dabei ist *Legionella species*, welche somit die epidemiologisch bedeutsamste Spezies darstellt.

Die klassische Legionärskrankheit, eine atypische und immer noch tödlich verlaufende Pneumonie, tritt vor allem bei Rauchern, älteren und immunsupprimierten Menschen auf. Die Anfangsstadien sind gekennzeichnet durch Übelkeit, Unwohlsein, Benommenheit, Kopf- und Gliederschmerzen sowie durch unproduktiven Husten. Manifestiert sich die Krankheit, so leiden die Patienten unter produktivem Husten, Atemnot, Brustschmerzen und Fieber, welches nicht selten auf über 40°C ansteigt und von Schüttelfrost begleitet ist. In komplizierten Fällen ist eine Legionelleninfektion mit einem ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) verbunden, was ein Multiorganversagen und damit den tödlichen Ausgang der Krankheit zur Folge hat.

Das ebenfalls durch Legionellen verursachte Pontiac-Fieber manifestiert sich klinisch mit grippeähnlichen Symptomen wie allgemeinem Unwohlsein, unproduktivem Hu-

sten, Fieber, Kopf und Gliederschmerzen. Außerdem sind bei vielen Patienten entzündliche Veränderungen im Bereich der Mundschleimhäute, eine Konjunktivitis und Meningismus zu finden. Das Pontiac-Fieber dauert zwei bis sieben Tage an und heilt folgenlos aus.

### 3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden sowie zusätzliches Material für den Nachweis von *Legionella-species*-DNA in klinischem Probenmaterial sowie in Umweltproben.

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der legionellenspezifischen Fluoreszenzsonden. Die Detektion erfolgt im FAM-Kanal.

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kit über eine Kontroll-DNA, die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum Einen das Aufdecken von Fehlern bei der DNA-Extraktion, zum Anderen kann eine mögliche Inhibition der PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der DNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal.

### 4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG191996) bzw. 32 (KG191932) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kits

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Reaction Mix	gelb	1 x 512 µl	2 x 768 µl
Positive control	rot	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	grün	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control DNA	transparent	1 x 160 µl	2 x 240 µl

### 5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, oder Nuk-Ex Complete Mag RNA/DNA, KG1020)

- Reinstwasser\*
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel
- optional: Pipettiergeräte zur Automation
- optional: BLP-DNA (bakterienähnliche Partikel, Details siehe Kapitel 11)

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln  $> 0,2\mu\text{m}$ ) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von  $0,055\mu\text{S}/\text{cm}$  bei  $25^\circ\text{C}$  ( $\geq 18,2\text{M}\Omega\text{cm}$ ).

## 6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei  $-18^\circ\text{C}$  zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate verwendbar. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

## 7 WICHTIGE HINWEISE

- Die MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

## 8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

## 9 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist DNA, die aus klinischen oder Umweltproben isoliert wurde.

## 10 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR ist geeignet für den Nachweis von *Legionella-species*-DNA, die zuvor aus mit Hilfe geeigneter Methoden aus Proben isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur DNA-Isolierung verwendet werden. Immundiagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038).

**Wichtig:** Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

**Beachten Sie bitte auch Kapitel 11 (Kontroll-DNA).**

Falls die Real-time-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die DNA-Extrakte entsprechend den Angaben des DNA-Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

## 11 KONTROLL-DNA

Der MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR enthält eine Kontroll-DNA, die zum einen als DNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Real-time-PCR aufzeigt.

Die bakterienähnlichen Partikel (*bacterium-like particles*, BLP) sind nicht im Kit enthalten.

## *DNA-Isolation aus klinischen und Umweltproben*

### **a) Kontroll-DNA oder BLP-DNA als Extraktionskontrolle**

MutaPLEX® *Legionella species* Kontroll-DNA oder BLP-DNA zur DNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-DNA oder BLP-DNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die DNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch. Setzen Sie anschließend die Real-time-PCR nach Protokoll A an.

**Die Kontroll-DNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.**

### **b) Kontroll-DNA als interne Kontrolle der Real-time-PCR**

Sollte keine Kontrolle der DNA-Extraktion gewünscht sein, wohl aber eine Kontrolle der PCR, so kann die Kontroll-DNA erst beim Ansetzen der PCR zugegeben werden. In diesem Fall ist die Real-time-PCR nach Protokoll B anzusetzen.

## **12 REAL-TIME-PCR**

### *12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn*

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Wichtige Hinweise“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gemischt (Reaktions-Mix nicht vortexen, sondern durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mischen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

### *12.2 Durchführung*

Falls die Kontroll-DNA oder BLP-DNA als echte Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-DNA lediglich zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der Real-time-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.



## Protokoll A

**Die Kontroll-DNA oder BLP-DNA wurde bereits zur DNA-Extraktion zugegeben** (siehe Kapitel 11 „Kontroll-DNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mix (Kontroll-DNA wurde während der DNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

## Protokoll B

Die Kontroll-DNA wird ausschließlich zur Kontrolle der Real-time-PCR verwendet (siehe Kapitel 11 „Kontroll-DNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mix (die Kontroll-DNA wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)
0,5 µl Control DNA *	0,5 µl x (N+1)*

\* Die durch Zugabe der Kontroll-DNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

## Protokoll A und B: Ansetzen der Real-time-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen.
- 16 µl des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.
- 4 µl der DNA-Eluat (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-time-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	16,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

### 12.3 Geräteeinstellungen

Für die Real-time-PCR ist das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 5: Real-time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1
cDNA-Amplifikation			45
Denaturierung	15 s	95 °C	
Annealing	30 s	60 °C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		
Verlängerung	30 s	72 °C	

Abhängig vom verwendeten Real-time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen	
LightCycler 480I	<i>Legionella species</i> Kontroll-DNA	483–533 523–568	Farbkompensationskit benötigt, z. B. Universal CC FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	<i>Legionella species</i> Kontroll-DNA	FAM (465–510) HEX (533–580)		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	<i>Legionella species</i> Kontroll-DNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference Dye: None

Real-time-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen	
ABI 7500	<i>Legionella species</i> Kontroll-DNA	FAM JOE	Option Reference Dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	<i>Legionella species</i> Kontroll-DNA	Grün Gelb	Gain 5 Gain 5	

### 13 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die *Legionella-species*-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-DNA wird im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal gemessen.

#### Folgende Ergebnisse können auftreten:

- **Im FAM-Kanal wird ein Signal detektiert:**

**Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält *Legionella-species*-DNA.**

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal nicht notwendig, da eine hohe *Legionella-species*-DNA-Konzentration zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der Kontroll-DNA führen kann (Kompetition).

- **Im FAM-Kanal wird kein Signal detektiert, jedoch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal:**

**Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine *Legionella-species*-DNA.**

Das detektierte Signal der Kontroll-DNA schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften DNA-Extraktion aus (falls die Kontroll-DNA als Extraktionskontrolle benutzt wurde). Außerdem ist die PCR nicht inhibiert. Unterscheidet sich der CT-Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe Kapitel „Problembehandlung“).

- **Weder im FAM- noch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal wird ein Signal detektiert:**

**Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.**

Die Real-time-PCR wurde inhibiert oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf. Wurde die Kontroll-DNA während der DNA-Extraktion zugefügt und

nicht direkt in den PCR-Master-Mix gegeben, dann ist die negative Kontrolle in beiden Kanälen negativ.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-PCR-Ergebnisse.

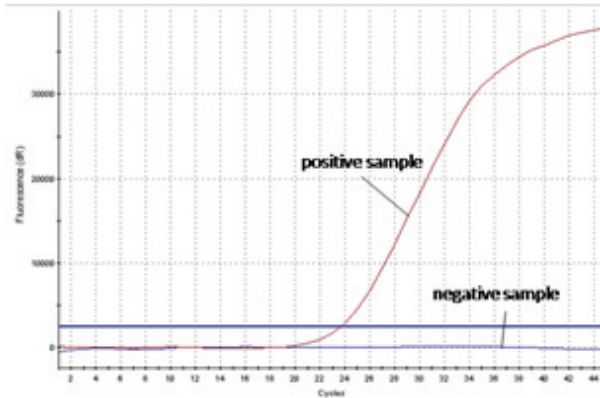


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im *Legionella-species*-spezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

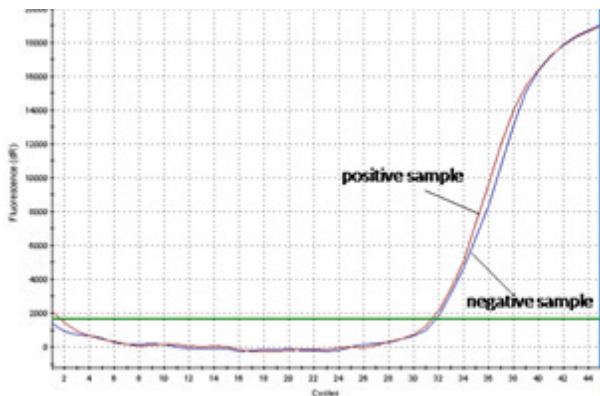


Abb. 2: Im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal. In diesem Fall liegt keine Inhibition der Real-time-PCR vor, auch verlief die DNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

## 14 VALIDIERUNGSDATEN

Stellen Sie die Grenzwerte des Real-time-Geräts wie im Folgenden beschrieben ein.

### **Negativkontrollen**

Alle Negativkontrollen sollten unter dem Grenzwert liegen. Im Falle einer möglichen Kontamination (Auftreten einer Kurve in der Negativkontrolle oder einer Anhäufung von Kurven in Proben mit hohem CT, beispielsweise über 36) sind die erhaltenen Ergebnisse nicht interpretierbar und der gesamte Lauf (inklusive der Extraktion) muss wiederholt werden.

### **Positivkontrollen**

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d. h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen CT-Wert von 30 fallen.

### **Interne Kontrollen**

Alle internen Kontrollen müssen eine positive, d. h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der CT-Wert der internen Kontrolle muss unter 33 liegen. Falls der CT-Wert der internen Kontrolle über 34 liegt, deutet dies auf ein DNA-Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die interne Kontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Falls eine Wasserkontrolle durchgeführt wurde, muss der CT-Wert der internen Kontrolle unter 33 liegen.

## **15 EINSCHRÄNKUNGEN**

Die Ergebnisse müssen stets im Kontext der klinischen Symptome betrachtet werden. Therapeutische Entscheidungen sollten unter Berücksichtigung klinischer Daten getroffen werden.

Ein negatives Testergebnis schließt eine *Legionella-species*-Infektion nicht aus.

## **16 PROBLEMBEHANDLUNG**

Die folgenden Problembeschreibungen sollen bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik.

### **Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle**

#### ***Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal***

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der *Legionella-species*-spezifischen Amplifikation und den VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-DNA .

***Fehlerhaftes Ansetzen der Real-time-PCR***

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

***Fehlerhaftes Real-time-PCR-Temperaturprofil***

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5).

***Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum***

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

**Schwaches oder kein Signal der Kontroll-DNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal*****Die Real-time-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein***

Überprüfen Sie die Real-time-PCR-Bedingungen (Kapitel 12).

***Real-time-PCR-Inhibition***

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der DNA-Elution wird empfohlen).

***Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses***

Falls die Kontroll-DNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte DNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

***Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum***

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

## Detektion eines Signals im FAM-Kanal der Negativkontrolle

### **Kontamination des Real-time-PCR-Ansatzes**

Wiederholen Sie die Real-time-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-time-PCR mit einem neuen Kit.

## 17 LEISTUNGSDATEN

### 17.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Während der Validierungsstudie des MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kits wurden 65 positive und 120 negative Proben getestet. Der Wert für sowohl diagnostische Spezifität als auch Sensitivität wurde mit 100% bestimmt (Tabelle 7).

Sowohl der positive als auch der negative Vorhersagewert liegen bei 100%.

Tabelle 7: Übersicht über getestete Probenanzahl sowie sich daraus ergebende positive und negative Vorhersagewerte.

	Positive Proben	Negative Proben
MutaPLEX® <i>Legionella species</i> positiv	65	0
MutaPLEX® <i>Legionella species</i> negativ	0	120
Sensitivität	100 %	
Spezifität	100 %	

### 17.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kits wurde anhand einer Suspension von *Legionella-pneumophila*-Serogruppe A ermittelt. Zunächst wurde die Konzentration der Suspension mittels des McFarlane-Standards bestimmt. DNA aus dezimalen Verdünnungsstufen der Suspensionen wurde isoliert und in Triplikaten im Test eingesetzt.

Die Bestimmungsgrenze ist definiert als die Konzentration von *Legionella pneumophila*, die in allen Triplikaten zuverlässig bestimmt werden kann. Für den MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kit wurde die Bestimmungsgrenze als 2 cfu (*colony forming units*, koloniebildende Einheiten) pro PCR-Bestimmung festgelegt. Tabelle 8 zeigt die Testergebnisse.

Tabelle 8: Analytische Sensitivität des MutaPLEX® *Legionella species* Real-time-PCR-Kits

Konzentration [cfu/Reaktion]	CT-Wert		
0,2	36,20	No CT	36,97
2,4	35,56	35,72	35,21
24	34,47	34,76	34,11
240	30,93	30,06	30,45
2 400	26,94	26,67	26,87
24 000	23,00	23,20	23,50
240 000	19,34	19,28	19,64
2 400 000	14,53	14,29	14,65

### 17.3 Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde anhand der in Tabelle 9 gelisteten Spezies bestimmt. Die Primer und Sonden detektieren alle *Legionella*-Spezies, aber keine anderen getesteten Pathogene.




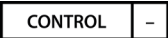



Tabelle 9: Für die Bestimmung der Primer- und Sondenspezifität des *Legionella species* Real-time-PCR-Kits verwendete Bakterienstämme

Spezies	ggf. Serogruppe	Ergebnis
<i>Legionella pneumophila</i>	1	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	2	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	3	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	4	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	5	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	6	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	8	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	9	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	10	positiv



Spezies	ggf. Serogruppe	Ergebnis
<i>Legionella pneumophila</i>	11	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	13	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	14	positiv
<i>Legionella pneumophila</i>	2-14	positiv
<i>Legionella bozemanii</i>		positiv
<i>Legionella gravella feeli</i>		positiv
<i>Legionella jordanis</i>		positiv
<i>Legionella micdadei</i>		positiv
<i>Legionella gormanii</i>		positiv
<i>Legionella dumdoffii</i>		positiv
<i>Escherichia coli</i>		negativ
<i>Salmonella enterica</i>		negativ
<i>Shigella sonnei</i>		negativ
<i>Listeria monocytogenes</i>		negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		negativ
<i>Adenovirus</i>		negativ
<i>Chlamydia pneumoniae</i>		negativ

## 18 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure	BLP	Bakterienähnliche Partikel
CT	Cycle Threshold		Kontroll-DNA
nn	nicht bekannt		Zu verwenden mit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Katalognummer
	Negativkontrolle		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Positivkontrolle		Obere Temperaturgrenze

**REACTION MIX**

Reaktionsmix



Hersteller

**CONT**

Inhalt



Verwendbar bis

Arbeitsanleitung  
beachten**LOT**

Chargennummer

**IVD***In-vitro*-Diagnos-  
tikum

## 19. LITERATUR

1. Heuner K; Swanson M (editors). (2008). Legionella: Molecular Microbiology. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-26-4
2. Legionella pneumophila. [www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Legionellen/EM\\_Tab\\_Legionella\\_pneumophila.html](http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Legionellen/EM_Tab_Legionella_pneumophila.html)

**MutaPLEX®**  
***Legionella species***  
**real time PCR kit**

***Test for the qualitative in vitro detection of Legionella species  
DNA in clinical specimens and environmental samples  
(e. g. water samples)***

Valid from 2017-02-09



**KG191932**  
**KG191996**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1</b>	<b>INTENDED USE</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>PATHOGEN INFORMATION</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>PACKAGE CONTENTS</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>IMPORTANT NOTES</b>	<b>20</b>
<b>8</b>	<b>GENERAL PRECAUTIONS</b>	<b>20</b>
<b>9</b>	<b>SAMPLE MATERIAL</b>	<b>21</b>
<b>10</b>	<b>SAMPLE PREPARATION</b>	<b>21</b>
<b>11</b>	<b>CONTROL DNA</b>	<b>21</b>
	<i>DNA isolation from clinical or environmental samples</i>	<i>21</i>
<b>12</b>	<b>REAL TIME PCR</b>	<b>22</b>
	<i>12.1 Important points before starting</i>	<i>22</i>
	<i>12.2 Procedure</i>	<i>22</i>
	<i>12.3 Instrument settings</i>	<i>23</i>
<b>13</b>	<b>DATA ANALYSIS</b>	<b>24</b>
<b>14</b>	<b>ASSAY VALIDATION</b>	<b>26</b>
<b>15</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>27</b>
<b>16</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>27</b>
<b>17</b>	<b>KIT PERFORMANCE</b>	<b>28</b>
	<i>17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity</i>	<i>28</i>
	<i>17.2 Analytical Sensitivity</i>	<i>29</i>
	<i>17.3 Analytical Specificity</i>	<i>29</i>
<b>18</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>30</b>
<b>19.</b>	<b>LITERATURE</b>	<b>31</b>

## 1 INTENDED USE

The MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR is an assay for the detection of *Legionella species* DNA in clinical specimens (e.g. throat swabs, nasal swabs, bronchial lavage) and environmental samples (e.g. water samples).

## 2 PATHOGEN INFORMATION

*Legionella* are widespread environmental germs which occur in natural and also artificial water carrying sources, such as plumbing fixtures and potable water systems. They also are able to infect protozoans and subsequently reproduce within these organisms. Temperatures between 30°C and 50°C and the ability to subsequently reproduce within these organisms increase their growth. From their natural habitat, *Legionella* are sometimes placed in the man-made water systems. Consequently, *Legionella* are also prevalent in anthropogenic waters such as potable water, cooling tower reservoirs, and whirlpools.

Aerosol-generating systems such as faucets, showerheads, cooling towers, and nebulizers aid in the transmission of *Legionella* from water to air. Human inhalation of contaminated aerosols leads to *Legionella* infections and disease outbreaks. Infection from inhaling airborne water droplets or mist containing viable *Legionella*, which are small enough to pass deep into the lungs and be deposited in the alveoli, the small pockets in the lungs. The bacteria rapidly reproduce within the macrophages. Although healthy individuals may develop Legionnaires Disease, people thought to be at increased risk of infection include smokers, patients with chronic respiratory diseases and any immunosuppressed condition. Initial symptoms of Legionnaires Disease include high fever, chills, headache and muscle pain. A dry cough soon develops and most patients suffer breathing difficulty. Some patients also develop diarrhea or vomiting and can become confused or delirious. Legionnaires Disease may not always be severe; in community outbreaks, mild cases may be recognized that would probably have escaped detection except for the increased awareness of the disease. A common but less serious infection caused by *Legionella species* is an illness known as Pontiac Fever. The symptoms of Pontiac Fever are similar to those of moderate to severe influenza: headache, fatigue, fever, joint pain, muscle pain and in a small proportion of cases, vomiting and coughing. The incubation period is one to two days and the illness passes in two to seven days.

### 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification and detection of *Legionella species* DNA in clinical specimens and environmental samples. The presence of nucleic acid is detected by an increase in fluorescence due to hydrolysis of the probes during amplification.

The fluorescence of the pathogen-specific probes is measured in the FAM channel.

Furthermore, MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR kit contains a control DNA, which is added during DNA extraction and detected in the same reaction by a differently labelled probe.

The control DNA allows the detection of PCR inhibition and acts as control for the isolation of the nucleic acid from the clinical specimen.

The fluorescence of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

### 4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 32 (KG191932) or 96 (KG191996) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Reaction Mix	yellow	1 x 512 µl	2 x 768 µl
Positive control	red	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	green	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control DNA	colourless	1 x 160 µl	2 x 240 µl

### 5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, or NukEx Complete Mag RNA/DNA, KG1020)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex mixer
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid

- Optional: Liquid handling system for automation
- Optional: BLP-DNA (bacterium-like particles, please see chapter 11 for details).

## 6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR-Kit is shipped on dry ice or cool packs. All components must be stored at maximum -18°C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package.

Up to 20 freeze and thaw cycles are possible.

For convenience, opened reagents can be stored at 2–8°C for up to 6 months.

Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

## 7 IMPORTANT NOTES

- The MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR must be performed by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

## 8 GENERAL PRECAUTIONS

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other materials must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with ethanol-free decontaminant.
- Do not combine MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR-Kit components of different lot numbers.

## 9 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR is DNA isolated or released from clinical specimens (e.g. throat swabs, nasal swabs, bronchial lavage) and environmental samples (e.g. water samples).

## 10 SAMPLE PREPARATION

The MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR is suitable for the detection of *Legionella species* DNA isolated from clinical specimens with appropriate isolation methods.

Commercial kits for DNA isolation such as MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) are recommended.

**Important:** In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control DNA in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the real time PCR. Furthermore, possible contaminations during DNA extraction will be detectable.

### **Please note chapter 11 “Control DNA”.**

If the real time PCR is not performed immediately, store extracted DNA according to the instructions given by the DNA extraction kit’s manufacturer.

## 11 CONTROL DNA

A control DNA is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the DNA isolation procedure and to check for possible real time PCR inhibition.

The bacterium-like particles (BLP-DNA) are not supplied.

### *DNA isolation from clinical or environmental samples*

#### **a) Control DNA or BLP-DNA used as extraction control**

MutaPLEX® *Legionella species* control DNA or BLP-DNA is added to the DNA extraction.

Add 5 µl control DNA or BLP-DNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the DNA isolation according to the manufacturer’s instructions. Please follow protocol A.

**The control DNA must be added to the lysis buffer of the extraction kit.**



**b) Control DNA used as internal control of the real time PCR**

If only inhibition will be checked, please follow protocol B.

**12 REAL TIME PCR****12.1 Important points before starting**

- Please pay attention to chapter 7 “Important Notes”.
- Before setting up the real time PCR familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run, one positive control and one negative control should be included.
- Before each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed (do NOT vortex the reaction mix but mix by pipetting up and down repeatedly), and centrifuged very briefly.
- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e.g. on ice or a cooling block) at all times.

**12.2 Procedure**

If the control DNA or BLP-DNA is used to control both, the real time PCR and the DNA isolation procedure, please follow protocol A. If the control DNA is solely used to detect possible inhibition of the real time PCR, please follow protocol B.

**Protocol A**

**The control DNA or BLP-DNA was added during DNA extraction (see chapter 11 “Control DNA”). In this case, prepare the master mix according to table 2.**

The master mix contains all of the components needed for PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix (control DNA was added during DNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

## Protocol B

The control DNA is used for the control of the real time PCR only (see chapter 11 “Control DNA”). In this case, prepare the master mix according to table 3.

The master mix contains all of the components needed for real PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 3: Preparation of the master mix (control DNA is added directly to the master mix)

Volume per reaction	Volume master mix
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)
0.5 µl Control DNA *	0.5 µl x (N+1)*

\*The increase in volume caused by adding the control DNA is not taken into account when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

## Protocol A and B: real time PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument.
- Pipet 16 µl of the master mix into each optical PCR reaction tube.
- Add 4 µl of the eluates from the DNA isolation (including the eluate of the water control), the positive control and the negative control to the corresponding optical PCR reaction tube (table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the real time PCR

Component	Volume
Master mix	16.0 µl
Sample	4.0 µl
Total volume	20.0 µl

## 12.3 Instrument settings

For the real time PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: real time PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Initial Denaturation	10 min	95 °C	1
Amplification of DNA			45
Denaturation	15 s	95 °C	
Annealing	30 s	60 °C	
	Aquisition at the end of this step		
Extension	30 s	72 °C	

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR.

Real time PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes	
LightCycler 480I	<i>Legionella species</i> control DNA	483–533 523–568	Color compensation kit needed, e.g. Universal CC FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	<i>Legionella species</i> control DNA	FAM (465–510) HEX (533–580)		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	<i>Legionella species</i> control DNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference dye: none
ABI 7500	<i>Legionella species</i> control DNA	FAM JOE	Option reference dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	<i>Legionella species</i> control DNA	Green Yellow	Gain 5 Gain 5	

### 13 DATA ANALYSIS

The *Legionella species*-specific amplification is measured in the FAM channel. The amplification of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

**The following results can occur:**

- **A signal in the FAM channel is detected:**

**The result is positive, the sample contains *Legionella species* DNA.**

In this case, detection of a signal of the control DNA in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is inessential, as high concentrations of *Legionella species* DNA may reduce or completely inhibit amplification of the control DNA .

- **No signal in the FAM channel, but a signal in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is detected:**

**The result is negative, the sample does not contain *Legionella species* DNA.**

The signal of the control DNA excludes the possibilities of DNA isolation failure (in case the control DNA is being used as an extraction control) and/or real time PCR inhibition. If the CT value of a sample differs significantly from the CT value of the water control, a partial inhibition occurred, which can lead to negative results in weak positive samples (see „Troubleshooting“).

- **Neither in the FAM nor in the VIC®/HEX/JOE/TET channel a signal is detected:**

**A diagnostic statement cannot be made.**

The DNA isolation was not successful or an inhibition of the PCR has occurred. In case the control DNA was added during DNA isolation and not directly to the PCR master mix, the negative control is negative in both channels.

Figure 1 and figure 2 show examples for positive and negative real time PCR results.

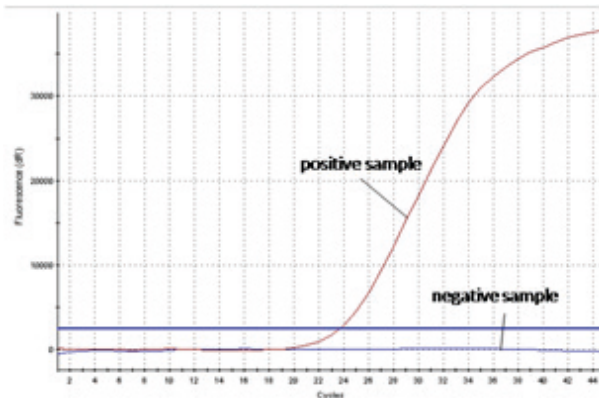


Figure 1: The positive sample shows *Legionella species*-specific amplification in the FAM channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

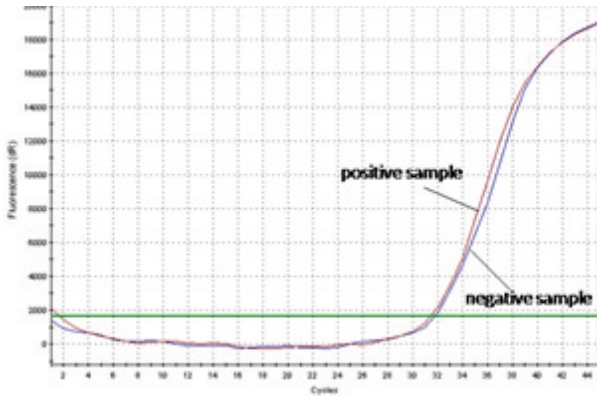


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample show a signal in the control DNA-specific VIC®/HEX/JOE/TET channel. The amplification signal of the control DNA in the negative sample shows that the missing signal in the *Legionella species*-specific FAM channel is not due to PCR inhibition or failure of DNA isolation, but that the sample is a true negative.

## 14 ASSAY VALIDATION

Set a threshold as follows:

### Negative controls

All negative controls should be below the threshold. If there is a potential contamination (appearance of a curve in the negative control or a cluster of curves in specimens at high CT – for example above 36), results obtained are not interpretable and the whole run (including extraction) has to be repeated.

### Positive controls

All the positive controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The positive controls must fall below a CT of 30.

### Internal controls

All internal controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The internal control must fall below a CT of 33. If the internal control is above CT 34, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IC. In the latter case, the assay is valid. If a water control run is performed, the IC must fall below a CT of 33.

## 15 LIMITATIONS OF THE METHOD

The results must always be considered in relation to the clinical symptoms. Therapeutical consequences should be made in consideration of clinical data.

A negative test result does not exclude a *Legionella species* infection.

## 16 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time PCR.

### No fluorescence signal in the FAM channel of the positive control

***The selected channel for analysis does not comply with the protocol***

Select the FAM channel for analysis of the virus-specific amplification and the VIC®/HEX/JOE/TET channel for the amplification of the control DNA .

***Incorrect configuration of the real time PCR***

Check your work steps and compare with chapter “Procedure”.

***The programming of the thermal profile is incorrect***

Compare the thermal profile with the protocol (table 5).

***Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired***

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter “Transport, Storage and Stability”.

### Weak or no signal of the control DNA and simultaneous absence of a signal in the virus-specific FAM channel

***real time PCR conditions do not comply with the protocol***

Check the real time PCR conditions (chapter 12).

***real time PCR inhibited***

Make sure that you use an appropriate isolation method (see “Sample preparation”) and follow the manufacturer’s instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the DNA.

**DNA loss during isolation process**

In case the control DNA was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the DNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer's protocol.

**Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired**

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, Storage and Stability".

**Detection of a fluorescence signal in the FAM channel of the negative control****Contamination during preparation of the PCR**

Repeat the real time PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time PCR.

**17 KIT PERFORMANCE****17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity**

During the validation study of the MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR kit, 65 positive and 120 negative samples were tested. The diagnostic sensitivity was found to be 100% and the diagnostic specificity 100% (table 7).

The positive predictive value was found to be 100%, the negative predictive value showed to be 100%.

Table 7: Overview of the amount of samples tested and the resulting positive and negative predictive values

	positive samples	negative samples
MutaPLEX® <i>Legionella species</i> positive	65	0
MutaPLEX® <i>Legionella species</i> negative	0	120
Sensitivity	100%	
Specificity	100%	

## 17.2 Analytical Sensitivity

In order to determine the analytical sensitivity, a suspension of *Legionella pneumophila* serogroup 1 was tested. At first, the concentration of the suspension was determined using McFarland Standard. DNA of decimal dilution series of these suspensions was isolated and tested in triplicates.

The limit of detection is defined as the concentration of *Legionella pneumophila* which can be reliably detected in all triplicates. For the MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR kit, the limit of detection was found to be ~2 cfu (colony forming units) per PCR reaction. Results are shown in table 8.

Table 8: Analytical sensitivity of the MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR kit

Concentration [CFU/reaction]	CT Value		
0.2	36.20	No CT	36.97
2.4	35.56	35.72	35.21
24	34.47	34.76	34.11
240	30.93	30.06	30.45
2,400	26.94	26.67	26.87
24,000	23.00	23.20	23.50
240,000	19.34	19.28	19.64
2,400,000	14.53	14.29	14.65

## 17.3 Analytical Specificity

The specificity was tested using the species listed in table 9. The primers and probes detected all *Legionella species* but not any other pathogen tested.

Table 9: Bacterial strains used for the determination of the specificity of primers and probes of the MutaPLEX® *Legionella species* real time PCR kit.

Species	Serogroup	Result
<i>Legionella pneumophila</i>	1	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	2	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	3	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	4	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	5	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	6	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	8	positive



Species	Serogroup	Result
<i>Legionella pneumophila</i>	9	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	10	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	11	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	13	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	14	positive
<i>Legionella pneumophila</i>	2-14	positive
<i>Legionella bozemanii</i>		positive
<i>Legionella gravella feeli</i>		positive
<i>Legionella jordanis</i>		positive
<i>Legionella micdadei</i>		positive
<i>Legionella gormanii</i>		positive
<i>Legionella dumdoffii</i>		positive
<i>Escherichia coli</i>		negative
<i>Salmonella enterica</i>		negative
<i>Shigella sonnei</i>		negative
<i>Listeria monocytogenes</i>		negative
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		negative
Adenovirus		negative
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>		negative

## 18 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleid Acid	BLP	Bacterium-Like Particles			
CT	Cycle threshold	<table border="1"><tr><td>CONTROL DNA</td><td>IC</td></tr></table>	CONTROL DNA	IC	Control DNA	
CONTROL DNA	IC					
nn	not known	<table border="1"><tr><td>→REF</td></tr></table>	→REF	To be used with		
→REF						
PCR	Polymerase Chain Reaction	<table border="1"><tr><td>REF</td></tr></table>	REF	Catalog number		
REF						
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>-</td></tr></table>	CONTROL	-	Negative control	<table border="1"><tr><td>∑</td></tr></table>	∑	Contains sufficient for <n> test
CONTROL	-					
∑						



Positive control



Upper limit of temperature



Reaction Mix



Manufacturer



Content



Use by



Consult instructions for use



Lot number



In vitro diagnostic medical device

## 19. LITERATURE

1. Heuner K; Swanson M (editors). (2008). Legionella: Molecular Microbiology. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-26-4
2. Legionella pneumophila. [www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Legionellen/EM\\_Tab\\_Legionella\\_pneumophila.html](http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Legionellen/EM_Tab_Legionella_pneumophila.html)