

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Legionella**

Enzymimmunoassay zum Antigennachweis von  
L. pneumophila der Serogruppe 1 in Urin

Enzyme immunoassay for the antigen detection of  
L. pneumophila serogroup 1 in urine

Art. No.: C 8001

In vitro Test

Lagerung bei 2 – 8 °C

Storage at 2 – 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

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

Anschrift:

R-Biopharm AG  
Dolivostr. 10  
D-64293 Darmstadt  
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0  
Sekretariat Marketing (0 61 51) 81 02-23

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20  
orders@r-biopharm.de

Marketing (0 61 51) 81 02-40  
info@r-biopharm.de

RIDA<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

---

RIDA<sup>®</sup> and RIDASCREEN<sup>®</sup>  
are registered trademarks of R-Biopharm AG  
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

## Inhaltsverzeichnis

|   | Seite |
|---|-------|
| 1. Allgemeines .....  | 4     |
| 2. Einleitung .....   | 4     |
| 3. Testprinzip .....  | 5     |
| 4. Packungsinhalt .....   | 6     |
| 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör ..... | 7     |
| 6. Vorsichtsmaßnahmen .....                                       | 7     |
| 7. Reagenzien und ihre Lagerung .....                             | 8     |
| 8. Anzeichen für Reagenzienverfall .....                          | 8     |
| 9. Sammlung und Lagerung der Proben .....                         | 9     |
| 10. Testdurchführung .....  | 9     |
| 11. Auswertung .....  | 12    |
| 12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation .....        | 14    |
| 13. Klinische Ergebnisse .....                                    | 15    |

## Contents

|   | page |
|---|------|
| 1. Intended use .....   | 18   |
| 2. General .....  | 18   |
| 3. Test principle .....   | 19   |
| 4. Reagents provided .....                                      | 20   |
| 5. Reagents required but not provided .....                     | 20   |
| 6. Warnings and precautions for the users .....                 | 21   |
| 7. Storage instructions .....                                   | 21   |
| 8. Indication of instability or deterioration of reagents ..... | 22   |
| 9. Specimen collection and storage .....                        | 22   |
| 10. Test procedure .....  | 23   |
| 11. Analysis .....  | 25   |
| 12. Remarks about the test procedure and interpretation .....   | 27   |
| 13. Clinical results .....                                      | 27   |

## Appendix

|                  |    |
|------------------|----|
| Literature ..... | 31 |
|------------------|----|

## 1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® Legionella-Test ist ein in vitro Diagnostikum zum Nachweis von *Legionella pneumophila* Antigen der Serogruppe 1 in Urin. Er dient als Ergänzung zur Kultur bei Verdachts-Diagnose einer vergangenen oder akuten Legionärskrankheit.

## 2. Einleitung

*Legionella pneumophila* wurde erstmals im Jahr 1976 nach einem größeren Ausbruch von Pneumonie anlässlich eines Treffens ehemaliger amerikanischer Legionäre in Philadelphia (Pennsylvania) isoliert und charakterisiert. Daher stammt auch der Name „Legionärskrankheit“. *Legionella Pneumophila* wird heute als häufige Ursache einer gemeinschaftlich erworbenen nosokomialen Pneumonie erkannt. *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 verursacht die meisten Fälle von Legionellose (80 – 85%). Die Krankheit manifestiert sich in einem breiten Spektrum von Krankheiten, d.h. von einem milden und oft trockenen Husten und Fieber bis hin zu einem vollständigen Versagen des Atmungssystems und anderer Organe. Außerdem treten bei der Legionellenpneumonie gastrointestinale Symptome auf. Die Infektion der Legionärskrankheit erfolgt u.a. durch die Inhalation von Aerosolen, die bei Klimaanlage, Atemtherapiegeräten und Whirlpools entstehen können. Ältere Personen sind am anfälligsten, obwohl Kinder und Neugeborene ebenfalls betroffen sind. Zu den Risikofaktoren zählen Rauchen, Immunsuppression, Alkoholkonsum und eine gleichzeitige Lungenerkrankung. Ca. 80% der Patienten mit Legionellenpneumonie scheiden in ihrem Urin lösliches Legionellen-Antigen aus. Das bietet die Möglichkeit für einen schnellen Nachweis des *Legionellen-Urin-Antigens* (LUA) in einer Urinprobe. Eine schnelle Diagnose und frühe Einleitung der entsprechenden antimikrobiellen Therapie kann die Mortalität einer Legionellenpneumonie, die bei nicht behandelten immunkompetenten Patienten bis zu 25% betragen kann, bedeutend reduzieren.

Traditionelle Labormethoden zum Nachweis von *Legionella pneumophila* verursachter Pneumonie erfordern zur genauen Diagnose geeignetes Probenmaterial aus dem Respirationstrakt (z.B. Sputum, bronchoale Lavage, Transtracheal-Aspirat, Lungenbiopsie) oder gepaarte Serumproben (akut und rekonvaleszent). Eine Laboranalyse von respiratorischem Untersuchungsmaterial beinhaltet eine traditionelle Kultur und Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern. Eine Alternative hierzu kann ein indirekter Fluoreszenz-Antikörper-Nachweis mit gepaarten Serumproben sein. Eine genaue Diagnose von *Legionella pneumophila* unter Anwendung dieser Methoden ist abhängig von einer sauberen Probengewinnung und dem Grad an verfügbaren technischen Fachkenntnissen. Der charakteristische Mangel an produktivem Sputum von Patienten mit Legionärskrankheit erfor-

dert invasive Verfahren, um geeignetes respiratorisches Untersuchungsmaterial für die Laboranalyse zu erhalten. Außerdem ist die Bereitschaft des Patienten zur Entnahme einer solchen Probe eher schlecht, und serologische Methoden sind nur retrospektiver Natur.

Aufgrund dieser Einschränkungen ist Urin das bevorzugte Untersuchungsmaterial bezüglich Entnahme, Transport und Nachweis während allen Stadien der Erkrankung. Berdal et al. berichteten ursprünglich über das Vorhandensein eines spezifischen löslichen Legionellen-Antigens in Urinproben von Patienten mit Legionärskrankheit. Schließlich wurden Immunoassays zum Nachweis dieses löslichen Legionellen-Antigens in Urin entwickelt. Der RIDASCREEN® Legionella-Test nutzt die ELISA-Technik zum Nachweis von löslichem *Legionellen-Urin-Antigen* (LUA) bei Patienten mit einer Infektion verursacht durch *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1.

### 3. Testprinzip

Bei dem vorliegenden Test handelt es sich um einen Enzymimmunoassay (ELISA). An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind spezifische Antikörper gegen *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 gebunden. In diese Vertiefungen werden Patientenproben sowie die Kontrollen pipettiert. Ein zweiter monoklonaler Antikörper gegen *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1, der mit POD konjugiert ist, wird dazugegeben. Anschließend wird bei 37 °C inkubiert. Bei Anwesenheit von *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisiertem Antikörper, Legionellen-Urin-Antigen und konjugiertem Antikörper. Nicht gebundene Enzym-markierte Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt.

Nach der Zugabe von zwei Substrat-Komponenten wandelt bei positiven Proben gebundenes Enzym die farblose Lösung in der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm. Die gemessene Farbintensität ist proportional zur Konzentration der in der Probe befindlichen Antigenmenge.

Alternativ dazu können die Ergebnisse auch unter Verwendung der mitgelieferten visuellen Interpretationskarte abgelesen werden.

#### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen (teilbar) im Halterahmen;  
beschichtet mit gereinigten Antikörpern (Kaninchen) gegen  
*Legionella pneumophila* der Serogruppe 1;  
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 x Waschkonzentrat (100 ml, 20fach konz.);  
enthält Thimerosal
- 1 x Positiv-Kontrolle (1,5 ml);  
Humanurin mit Antigen von *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1  
gebrauchsfertig, enthält Konservierungsmittel
- 1 x Negativ-Kontrolle (1,5 ml);  
Humanurin  
gebrauchsfertig, enthält Konservierungsmittel
- 1 x Konjugat (6,5 ml);  
Peroxidase-markierter, gereinigter Antikörper (Kaninchen) gegen  
*Legionella pneumophila* der Serogruppe 1;  
Puffer enthält Protein-Stabilisator  
rot gefärbt, gebrauchsfertig
- 1 x Substrat A (12 ml);  
enthält Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig
- 1 x Substrat B (12 ml);  
enthält Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); gebrauchsfertig
- 1 x Stopp-Reagenz (12 ml);  
1 M Phosphorsäure
- 1 x Abdeckplatte;  
zum Abdecken der Mikrotiterstreifen während der Inkubation zur  
Vermeidung von Verdunstungsverlusten
- 1 x visuelle Interpretationskarte
- 1 x Gebrauchsanleitung

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

### 5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

### 5.2. Zubehör

- Mikropipette für 50 µl und 100 µl Volumina
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette bzw. Waschflasche
- Graduierter Zylinder zum Verdünnen der Waschlösung (1:20)
- Inkubator (kein CO<sub>2</sub>!) oder Wärmeblock für 37 °C
- Filterpapier (Labortücher)
- Timer mit Alarm

#### Optional:

- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm)

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindliche Positiv-Kontrolle enthält autoklaviertes Legionella-Urin-Antigen. Dennoch sollte sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Das Konjugat und der Waschpuffer enthalten als Konservierungsmittel Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 M Phosphorsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht möglich.

Mikrotiterstreifen oder Reagenzien dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Fläschchen undicht sind.

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 – 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Stopp-Reagenz und Wasch-Konzentrat können bei 2 – 30 °C gelagert werden.

Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 30 °C eine Woche lang haltbar.

Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, daß der Klippverschluß nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf die farblosen Substrat-Komponenten ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autoxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung können die Substrat-Komponenten nicht mehr verwendet werden.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung der farblosen Substrat-Komponenten vor Zugabe in die Kavitäten
- ein Extinktionswert der Negativ-Kontrolle größer 0,120 OD
- ein Extinktionswert der Positiv-Kontrolle kleiner als der 4fache OD-Wert der Negativkontrolle

Bei Benutzung der visuellen Interpretationskarte muss die Negativ-Kontrolle deutlich negativ (d.h. farblos) sein.

Die Positiv-Kontrolle sollte den Wert +2 oder mehr erreichen, d.h. eine deutlich erkennbare gelbe Färbung zeigen.

Reagenzien, die eine Trübung aufweisen, dürfen nicht verwendet werden.



## 9. Sammlung und Lagerung der Proben

Die Sammlung der Proben sollte in sterilen Transportbehältern erfolgen. Wenn möglich, sollten die Urinproben in auslaufsicheren Behältern gekühlt oder tiefgefroren versendet werden.

Patienten-Urinproben können frisch oder tiefgefroren verwendet werden. Frische, nicht konservierte Proben sind bei 2 - 8 °C oder Raumtemperatur zu lagern und innerhalb von 24 Stunden zu testen.

Proben, die in dieser Zeitspanne nicht getestet werden können, können nach der Entnahme bis zu 14 Tage bei 2 - 8 °C gelagert werden.

Eine längere Aufbewahrung der Proben ist bei -70 °C möglich. Das Tiefgefrieren hat keinen nachteiligen Einfluß auf das Testergebnis. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen muß aber vermieden werden.

Urinproben, die bei weniger als 8 °C gelagert wurden und die in hohen Konzentrationen Harnstoff, Phosphate oder andere gelöste Salze enthalten, können nach der Lagerung Kristalle bilden. Vor der Testung müssen alle Proben auf Raumtemperatur gebracht werden. Zur Lösung der Kristalle dürfen die Proben auf 37 °C erwärmt werden. Kontaminierte und sehr trübe Urinproben sollten vor der Testung filtriert werden.

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Allgemeines

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.

Vor Verwendung sind alle Reagenzien sowie die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab. Während des Waschens ist darauf zu achten, dass alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und dass zwischen den Waschsritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschsritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.

Bei Nutzung von Waschautomaten ist darauf zu achten, dass keine Waschprogramme verwendet werden, die einen Einweichschritt enthalten.

Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.

Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

## 10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates wird mit 19 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Der fertige Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C eine Woche lang haltbar.

## 10.3. Vorbereitung der Proben

Die Urinproben werden unverdünnt im Test eingesetzt. Es ist sicher zu stellen, dass die Proben vor Einsatz im Test auf Raumtemperatur gebracht wurden. Besonders trübe oder kontaminierte Urinproben sollten vor der Testdurchführung filtriert werden.

### **Hinweis:**

**Proben, die bei 8°C oder niedriger gelagert wurden, können u.U. nach der Lagerung Kristalle bilden. Zur Lösung der Kristalle dürfen die Proben auf 37 °C erwärmt werden.**

### **Achtung!**

**Positiv- und Negativ-Kontrolle sind gebrauchsfertig und müssen auf dieselbe Weise wie die Patientenproben getestet werden.**

## 10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden je 100 µl der Positiv-Kontrolle, der Negativ-Kontrolle sowie der Urinproben in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Anschließend werden 50 µl des Konjugates zugegeben. Nach Durchmischung (leichtes Klopfen an den Plattenrand) werden die Mikrotiterstreifen mit der beiliegenden Abdeckplatte abgedeckt und 50 Minuten bei 37 °C inkubiert.

## 10.5. Waschen

Nach Entfernen der Abdeckplatte werden die Kavitäten geleert und die Platte anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 4 mal mit jeweils 400 µl der vorbereiteten Waschlösung gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

**Bei Verwendung eines Waschautomaten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden. Die Kavitäten dürfen nach dem Waschen**

**keine Restflüssigkeit mehr enthalten. Nach dem letzten Waschschrift sollte die Platte deshalb gründlich auf Labortüchern ausgeschlagen werden.**

#### 10.6. Zweite Inkubation

Nach dem Waschen werden in alle Vertiefungen je 50 µl des Substrates A und direkt danach je 50 µl des Substrates B pipettiert \*). Die Mikrotiterstreifen werden wieder mit der beiliegenden Abdeckplatte abgedeckt und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Danach wird durch Zugabe von je 100 µl Stopplösung in alle Kavitäten die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Klopfen an den Plattenrand) wird die Extinktion innerhalb von 15 Minuten in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen.

Alternativ dazu können die Ergebnisse auch visuell mit der beiliegenden Interpretationskarte ermittelt werden.

\*) alternativ können Substrat A und Substrat B unmittelbar vor der Verwendung in einem sauberen Behälter im Verhältnis 1+1 gemischt werden. Von der erhaltenen Lösung sind dann jeweils 100 µl pro Kavität zu pipettieren.

#### **Zusammenfassung der Testdurchführung**

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des Waschpuffers
3. Pipettieren von 100 µl der Positiv- und Negativ-Kontrolle sowie der Urinproben in die Mikrotiterstreifen
4. Zugabe von 50 µl Konjugat; 50 Minuten Inkubation bei 37 °C
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4-maliges Waschen mit 400 µl Waschpuffer
6. Zugabe von je 50 µl Substrat A und je 50 µl Substrat B; 10 Minuten Inkubation bei 37 °C
7. Nach Zugabe von 100 µl Stopp-Reagenz visuelle oder photometrische Auswertung (450 nm)

## 11. Auswertung

### 11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativ-Kontrolle mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Alternativ können auch bekannt-positive oder bekannt-negative Urinproben als Kontrollen verwendet werden. Die Kontrollen sind erforderlich, um eine eventuelle Reagenzienschwäche anzuzeigen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert der mitgelieferten Negativ-Kontrolle bei 450 nm kleiner oder gleich 0,120 ist, und der Extinktionswert der mitgelieferten Positiv-Kontrolle bei 450 nm mindestens den 4fachen OD-Wert der Negativkontrolle erreicht. Ist der Wert der Negativ-Kontrolle größer 0,120 OD, kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Werden die erwarteten Werte nicht erreicht, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Kitkomponenten sollten visuell auf Kontamination oder Undichtigkeiten kontrolliert werden. Im Falle einer Verfärbung der Substrat-Komponenten dürfen diese nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

Werden die o.a. Qualitätskriterien nicht erfüllt, dürfen die Testergebnisse der Patientenproben nicht gewertet werden.

## 11.2. Photometrische Auswertung

Zur Festlegung des Cut-offs wird die gemessene Extinktion der Negativ-Kontrolle mit dem Faktor 4 multipliziert:

$$\text{Cut-off} = 4 \times \text{Extinktionswert der Negativ-Kontrolle}$$

Als **positiv** werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert über dem errechneten Cut-off liegt.

Als **negativ** werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert unter dem errechneten Cut-off liegt.

Beispiel:

Extinktionswert der Negativ-Kontrolle = 0,052

Extinktionswert der Positiv-Kontrolle = 1,986

Extinktionswert der Patientenprobe 1 = 1,253

Berechnung des Cut-offs:  $\text{Cut-off} = 4 \times 0,052 = 0,208$

Ergebnis der Patientenprobe 1:  $1,253 > 0,208 = \text{positiv}$

## 11.3. Visuelle Auswertung

Eine Probe mit mindestens eindeutig gelber Färbung (visueller Wert von mind. +2) gilt als Legionella-Urin-Antigen **positiv**.

Eine Probe ohne gelbe Färbung oder mit schwacher gelber Färbung (visueller Wert von +1) gilt als Legionella-Urin-Antigen **negativ**.

Bitte vergleichen Sie mit der in diesem Kit enthaltenen visuellen Interpretationskarte:

|                      |     |                         |
|----------------------|-----|-------------------------|
| Negatives Ergebnis = | - : | keine gelbe Färbung     |
|                      | +1: | schwach gelbe Färbung   |
| Positives Ergebnis = | +2: | eindeutig gelbe Färbung |
|                      | +3: | stark gelbe Färbung     |
|                      | +4: | intensiv gelbe Färbung  |

## 11.4. Bewertung der Ergebnisse

| Testergebnis               | Beurteilung   |
|----------------------------|---|
| <b>Positiv</b> (> Cut-off) | Vorhandensein von <i>L. pneumophila</i> Antigen der Serogruppe 1 im Urin, was auf eine akute oder zurückliegende Infektion hindeutet.   |
| <b>Negativ</b> (< Cut-off) | Nicht – Vorhandensein von <i>L. pneumophila</i> Antigen der Serogruppe 1 im Urin, was auf keine akute oder kürzlich zurückliegende Infektion hindeutet. Eine Legionellose kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da auch andere Serogruppen oder Spezies Ursache der Krankheit sein könnten. |

## 12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Der RIDASCREEN® Legionella Test weist Antigen von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 in Urinproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Probenwertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus. Ein negatives Ergebnis schließt eine Legionellose nicht aus.

Das Ausscheiden von Legionella-Antigen im Urin kann in Abhängigkeit von dem einzelnen Patienten und dem Krankheits-Stadium variieren. Es wurde festgestellt, dass einige Personen Antigen über einen längeren Zeitraum ausscheiden können, so dass eine positive ELISA-Reaktion auch eine kürzlich durchgemachte, aber nicht aktive Infektion widerspiegeln kann.

Eine frühzeitige Behandlung mit entsprechenden Antibiotika kann bei manchen Personen die Ausscheidung von Antigen reduzieren. Die Ausscheidung von Antigen kann schon 3 Tage nach dem Erscheinen der Symptome beginnen und bis zu 1 Jahr danach persistieren.

### 13. Klinische Ergebnisse

#### 13.1. Zu erwartende Werte

Es wurden 266 wahlfrei ausgesuchte, vermutet negative und nicht charakterisierte Urinproben unter Verwendung des RIDASCREEN® Legionella-Tests auf Legionella-Urin-Antigen untersucht. Die Proben stammten aus vier Referenzlabors und beinhalteten sowohl frische als auch eingefrorene Proben. 263 Proben ergaben ein negatives Ergebnis. Drei weitere vermutet negative Proben ergaben einen schwach positiven Wert. Dies ergibt eine Genauigkeit von 98,9%.

| OD-Wert 450 nm    | 0,000-0,099  | 0,100-0,149 | 0,150-0,199 | 0,200-0,249 | 0,250-0,299 | > 0,299                         |
|-------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Anzahl der Proben | 250<br>(94%) | 7<br>(2,6%) | 4<br>(1,5%) | 1<br>(0,4%) | 1<br>(0,4%) | 3<br>(1,1%)<br>(falsch positiv) |

#### 13.2. Sensitivität und Spezifität

Die Eignung des RIDASCREEN® Legionella-Tests zum Nachweis von Legionellen-Urin-Antigen wurde in eine klinischen Studie durch ein führendes Referenzlabor für Infektionskrankheiten bewertet. Es handelte sich um eine retrospektive Studie mit einem Panel von klinisch gut charakterisierten Urinproben. Bei der Studie wurden 234 Urinproben sowohl mit dem RIDASCREEN® Legionella-ELISA als auch mit einem anderen kommerziellen EIA-Test für Legionellen-Urin-Antigen überprüft. Das Probenpanel bestand aus Urinproben von 94 kulturpositiven Patienten mit *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 und 140 kulturnegativen Patienten (Legionella negative Pneumonie, Bakteriämie, verschiedene Lungenerkrankungen und Harnwegsinfektionen). Die Ergebnisse beider Tests auf LUA im Vergleich zu den Kulturergebnissen waren wie folgt:

|  | Kultur (+)*<br>n=94 | Kultur (-)**<br>n=140 |
|--|---------------------|-----------------------|
| RIDASCREEN® Legionella ELISA auf LUA (+) n=104 | 89                  | 15                    |
| RIDASCREEN® Legionella ELISA auf LUA (-) n=130 | 5                   | 125                   |
| Sonstiger EIA-Test auf LUA (+) n=105           | 82                  | 23                    |
| Sonstiger EIA-Test auf LUA (-) n=129           | 12                  | 117                   |

\* Positive Kultur des respiratorischen Untersuchungsmaterials für *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 (n=94)

\*\* Negative Kultur des respiratorischen Untersuchungsmaterials, Blutes oder Urins für *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 (n=140)  
Insgesamt n=234

Daraus errechnen sich für den RIDASCREEN® Legionella-ELISA Sensitivität und Spezifität wie folgt:

Sensitivität = 89/94 = 94,7 % (95 % Vertrauensintervall = 90,1 – 99,2 %)  
 Spezifität = 125/140 = 89,3 % (95 % Vertrauensintervall = 84,2 – 94,4 %)  
 Genauigkeit = 214/234 = 91,4 % (95 % Vertrauensintervall = 87,9 – 95,0 %)

Ein zweiter prospektiver klinischer Versuch identifizierte 127 frisch entnommene Urinproben von nicht an Legionellose erkrankten Patienten mit tiefen respiratorischen Infektionen, Sepsis oder Harnwegsinfektionen und abnormalen Urinproben als richtig negativ.

|   | Kultur (+)*<br>n=0 | Kultur (-)**<br>n=127 |
|---|--------------------|-----------------------|
| RIDASCREEN® Legionella ELISA auf LUA (+)<br>n=0   | 0                  | 0                     |
| RIDASCREEN® Legionella ELISA auf LUA (-)<br>n=127 | 0                  | 127                   |

\* Positive Kultur des respiratorischen Untersuchungsmaterials für *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 (n=0)

\*\* Negative Kultur des respiratorischen Untersuchungsmaterials, Blutes oder Urins für *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 (n=127)  
 Insgesamt n=127

### 13.3. Kreuzreaktivität

Bei der klinischen Studie hatten von den 140 eingefrorenen Legionellen-negativen Proben 50 Pneumonie (keine Legionellen), 25 waren bakteriämisch (keine Legionellen), 15 hatten andere Lungenerkrankungen und 50 hatten eine Harnwegsinfektion. Von den 15 Proben mit einem falsch positiven Ergebnis stammten 14 von Patienten mit Bakteriämie (*Streptococcus pneumoniae*) und ein Patient hatte eine Harnwegsinfektion (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*). In einem zweiten klinischen Versuch zur Spezifität, bei dem frisch entnommene Urinproben verwendet wurden, wurde jedoch bei keinem Patienten mit Sepsis oder Pneumonie (23 Patienten), mit einer positiven Urinkultur (25 Patienten) oder mit einer Harnwegsinfektion (9 Patienten) ein falsch positives Ergebnis erzielt.



## 13.4. Präzision

Die Intra Assay-Reproduzierbarkeit wurde mittels dreier Urinproben mit unterschiedlichen Antigenkonzentrationen (negativ, niedrig positiv, hoch positiv) bestimmt. Die Urinproben wurden im 30fachen Ansatz mit Kits von drei verschiedenen Chargen durchgeführt. Jede Probe wurde mit 98,5 %iger Richtigkeit als positiv oder negativ beurteilt.

| Probe           | Mittelwert OD | Standardabweichung | Variationskoeffizient |
|-----------------|---------------|--------------------|-----------------------|
| negativ         | 0,08          | 0,011              | 13,8                  |
| niedrig positiv | 0,34          | 0,034              | 10,0                  |
| hoch positiv    | 1,31          | 0,100              | 7,6                   |

Die Inter Assay-Reproduzierbarkeit wurde unter Verwendung von 8 Urinproben mit unterschiedlichen Antigenkonzentrationen ermittelt. Die Proben wurden hergestellt, indem eine Reihe von normalen, humanen Urinproben ein Hitzeextrakt von *Legionella pneumophila* in Konzentrationen zugesetzt wurde, die niedrig positive (B, F), mittel positive (A), hoch positive (C, E), erhöht negative (D) und klar negative (G, H) OD-Ergebnisse erzielten. Diese acht Proben wurden maskiert und an drei Stellen zur Bewertung verteilt. An jeder Stelle wurden alle acht behandelten Urinproben dreifach getestet, wobei drei verschiedene Kit-Serien an drei verschiedenen Tagen verwendet wurden. Die Proben wurden in 100 % der Fälle richtig positiv oder negativ gefunden.

| Probe | Mittelwert OD | Standardabweichung | Variationskoeffizient | n = |
|-------|---------------|--------------------|-----------------------|-----|
| A     | 1,72          | 0,23               | 13,31                 | 26  |
| B     | 1,07          | 0,16               | 14,79                 | 26  |
| C     | 2,89          | 0,27               | 9,42                  | 21* |
| D     | 0,15          | 0,02               | 16,12                 | 26  |
| E     | 2,65          | 0,32               | 12,19                 | 25* |
| F     | 0,74          | 0,13               | 17,18                 | 26  |
| G     | 0,08          | 0,01               | 16,18                 | 26  |
| H     | 0,09          | 0,02               | 21,48                 | 26  |

\* Die Probendaten wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen, da der OD-Wert die Ablesegrenze des Photometers überschritt. Über den Meßbereich hinausgehende Proben wurden bezüglich des Urin-Antigens *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 als positiv bewertet.

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Legionella

Enzyme immunoassay for the antigen detection of  
*L. pneumophila* serogroup 1 in urine

## 1. Intended use

The RIDASCREEN<sup>®</sup> Legionella kit is an in vitro diagnosticum for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. It is intended as an adjunct to culture for the presumptive diagnosis of past or current Legionnaires' Disease.

## 2. General

*Legionella pneumophila* was first isolated and characterized in 1976 after a major outbreak of pneumonia at an American Legion convention in Philadelphia, Pennsylvania; thus the name, " Legionnaires' Disease". *Legionella pneumophila* is now recognized to be a common cause of community-acquired and nosocomial pneumonia. *Legionella pneumophila* serogroup 1 causes the majority of cases of legionellosis (80 – 85%). The disease presents with a broad spectrum of illness, ranging from a mild, often non-productive cough and fever to complete respiratory and multi-organ failure. In addition, gastrointestinal symptoms are prominent in Legionella pneumonia. Legionnaires' Disease can be acquired by the inhalation of aerosols associated with air handling systems, respiratory therapy equipment, and whirlpool baths. The elderly are seen as most susceptible, although children and neonates are also affected. Risk factors include cigarette smoking, immunosuppression, alcohol consumption and concomitant pulmonary disease. Approx. 80% of Legionella pneumonia patients excrete soluble Legionella antigen in their urine. This presents the opportunity for rapid detection of Legionella urinary antigen (LUA) in a urine specimen. Rapid diagnosis and early initiation of appropriate antimicrobial therapy can significantly reduce the mortality associated with *Legionella pneumophila*, which has a reported mortality rate of up to 25% in untreated immunocompetent patients.

Traditional laboratory methods for the detection of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* infection require an adequate respiratory specimen (e.g. sputum, bronchial washing, transtracheal aspirate, lung biopsy) or paired serum specimens (acute and convalescent) for accurate diagnosis. Laboratory analysis of respiratory specimens includes traditional culture and fluorescent antibody staining. Alternatively, indirect fluorescent antibody testing of paired specimens can be performed on serum. Accurate diagnosis of *Legionella pneumophila* using these methods depends upon proper specimen collection and the level of technical expertise available. The characteristic lack of productive sputum by Legionnaires' Disease patients necessitates invasive procedures to obtain an adequate respiratory specimen for laboratory analysis. Furthermore, patient compliance in obtaining the specimens can be poor, and serological methods are retrospective in nature.

Because of these limitations, urine is the preferred specimen for collection, transport and detection in all phases of the disease. Berdal originally reported the presence of a specific soluble Legionella antigen in the urine of patients with Legionnaires' Disease. Subsequently, immunoassays were developed for the detection of this soluble Legionella antigen in urine. The RIDASCREEN® Legionella test employs the ELISA technique for the detection of soluble Legionella urinary antigen (LUA) in patients with *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection.

### **3. Test principle**

This test is an enzyme immunoassay (ELISA). On the surface of the microtiter wells, specific antibodies against *Legionella pneumophila* serogroup 1 are bound. Urine samples and controls are pipetted into the wells. A second monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase is added and then incubated at 37 °C. The simultaneous incubation results in the Legionella urinary antigen being sandwiched between the solid phase and enzyme-linked antibodies. Unbound POD-conjugate is removed by washing.

Substrate A and Substrate B are added to the wells and incubated. The enzyme bound in the wells converts the colorless Substrate to a blue color. Addition of Stop Solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength. The color intensity is directly proportional to the amount of antigen present in the sample.

Alternatively, the results can be visually read using the Visual Interpretation Card provided.

## 4. Reagents provided

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.

Each test kit contains:

- 1x 12 Microtiterstrips with 8 wells each (divisible) in a frame;  
coated with purified antibodies (rabbit) against  
*Legionella pneumophila* serogroup 1
- 1 x Wash Concentrate (100 ml; 20x conc.)  
contains Thimerosal
- 1 x Positive Control (1.5 ml);  
human urine containing *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen;  
ready to use, contains preservative
- 1 x Negative Control (1.5 ml);  
human urine;  
ready to use, contains preservative
- 1 x Conjugate (6.5 ml);  
HRP-conjugated, purified antibody (rabbit) against  
*Legionella pneumophila* serogroup 1;  
dyed red, ready to use
- 1 x Substrate A (12 ml);  
Tetramethylbenzidine (TMB); ready to use
- 1 x Substrate B (12 ml);  
Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); ready to use
- 1 x Stop Solution (12 ml);  
1 M phosphoric acid
- 1 x Plate lid;  
for covering stripwells during incubations to prevent evaporation
- 1 x Visual Interpretation Card
- 1 x Instructions for use

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1. Reagents

- Distilled or deionized water

## 5.2. Accessories

- micropipet for volumes of 50 µl and 100 µl
- microplate washer or multichannel pipet, alternatively wash bottle
- graduated cylinder to dilute Wash Solution (1:20)
- incubator (non-CO<sub>2</sub>!) or heat block capable to 37 °C
- paper towels
- timer with alarm

### optional:

- microplate reader (450 nm)

## 6. Warnings and precautions for the users

The Positive Control inside the kit contains autoclaved antigen of *Legionella pneumophila* serogroup 1. However, the Positive Control as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

The Conjugate and the Wash Concentrate contain Thimerosal. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

Hydrogen peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The Stop Solution contains 1 M phosphoric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of individual reagents between kits of different lot numbers is not possible.

Microtiterstrips and reagents must not be used if pouch is damaged or vials are leaking.

## 7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 – 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.

Stop Solution as well as Wash Concentrate may be stored at 2 – 30 °C.

The diluted Washing Buffer has a shelf life of one week if stored at 2 – 30 °C.

Allow reagents and Microwell Strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having

reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 – 8 °C.

The colorless Substrate-solutions must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autoxidation. If the Substrate-solutions turn blue, the reagents should be discarded.

## **8. Indication of instability or deterioration of reagents**

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the Substrate-solutions prior to their use
- an absorbance value of the Negative Control higher than 0.120
- an absorbance value of the Positive Control lower than 4 x O.D. of Negative Control

If using visual interpretation, the Negative Control must be clearly negative (colorless), and the Positive Control should be +2 or greater, showing a definite yellow color.

Reagents which show a turbidity must not be used in the assay.

## **9. Specimen collection and storage**

Urine specimens should be collected in standard sterile containers. Whenever possible, urine specimens should be shipped in leak-proof containers at 2 – 8 °C or frozen.

Urine samples can be used fresh or frozen. Fresh samples that have not been preserved should be stored at 2 - 8 °C or at room temperature and should be tested within 24 h.

Alternatively, specimens may be stored at 2 – 8 °C for up to 14 days or frozen (-70 °C) for longer periods before testing. Deep freezing does not pose a negative influence on the test results. Repeated thawing and freezing must be avoided.

Urine specimens stored below 8°C which contain excess urates, phosphates or other dissolved salts may develop salt crystals after storage. Insure all samples are at room temperature prior to running in the assay. For dissolving the crystals the samples can be heated up to 37 °C. Contaminated or very turbid samples should be filtered before use.

## 10. Test procedure

### 10.1. Preliminary comments

The test has to be used only by experienced laboratory personnel. Please refer to guidelines for safety regulations in medical laboratories. The test protocol must be followed strictly.

Bring all reagents and the microtiterstrips to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences. During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow microwells to dry between steps.

In addition, do not use wash programs that include a soaking step.

Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.

Except of the Washing Buffer, all reagents are ready to use.

### 10.2. Preparation of the Washing Buffer

1 part of the Wash Concentrate is diluted with 19 parts of distilled water. The diluted Washing Buffer has a shelf life of one week if stored at 2 – 8 °C.

### 10.3. Preparation of the samples

Urine specimens are used directly in the assay. It has to be insured that all samples are at room temperature prior to running in the assay. Contaminated or very turbid samples should be filtered before use.

#### **Remark:**

**Urine specimens stored below 8°C which contain excess urates, phosphates or other dissolved salts may develop salt crystals after storage. For dissolving the crystals the samples can be heated up to 37 °C.**

#### **Attention!**

**Positive Control as well as Negative Control are ready for use and have to be tested in the same way as the patients' samples.**

#### 10.4. First incubation

After a sufficient number of wells for samples and controls have been placed into the microtiter well holder, 100 µl of the Positive Control, the Negative Control and the samples are pipetted into separate wells. 50 µl of conjugate are added to each well. After covering the microwells with the enclosed plate lid, mix by gently swirling on tabletop and incubate at 37 °C for 50 minutes.

#### 10.5. Washing

Remove plate lid and decant or aspirate all wells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the wells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Fill 400 µl of prepared Washing Buffer in all wells. Repeat the wash cycle 4 times. Be sure to remove residual washing solution by firmly tapping the inverted microwells on absorbent paper after final washing.

**If a microplate washer is used, be sure that the liquid is completely sucked off. After final washing step the inverted microwells should be firmly tapped on absorbent paper.**

#### 10.6. Second incubation

Add 50 µl of Substrate A and 50 µl of Substrate B into each well \*). Cover the plate with the enclosed plate lid and incubate the plate for 10 min at 37 °C. Following the incubation, the reaction is stopped by adding 100 µl Stop Solution to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured at 450 nm against an air blank or read visually by using the Visual Interpretation Card.

\*) alternatively, pre-mix immediately before use adequate equal volumes of Substrate A and Substrate B in a clean trough, mix gently and pipette 100 µl into all wells.

#### **Summary of the test procedure**

1. Bring all reagents to room temperature
2. Dilute the Wash Concentrate
3. Pipet 100 µl of the samples, the Positive and Negative Control into the microwells
4. Add 50 µl of Conjugate; 50 minutes incubation at 37 °C
5. Discard the incubate and wash 4 times with 400 µl of Washing Buffer



6. Add 50 µl of Substrate A and 50 µl of Substrate B; 10 minutes incubation at 37 °C
7. After addition of 100 µl Stop Solution visual or spectrophotometric determination (450 nm)

## 11. Analysis

### 11.1. Quality control

For quality control, the Positive and Negative Control must be included in each assay, to ensure reagent stability and correct performance of the assay procedure. Alternatively, known positive and negative urine specimens may be run as controls. Controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The assay run is correct, if the OD for the enclosed Negative Control is below 0.120 and the OD for the enclosed Positive Control is above the four-fold value of the Negative Control. If the Negative Control yields absorbance values >0.120 this may indicate insufficient washing. If the expected control values are not fulfilled please check the following before repeating the test:

- Expiration date of the reagents
- Calibration of the used instruments
- Exact test procedure
- Visual examination of kit components for signs of contamination, deterioration or leakage; Substrate solutions must not be used if turned blue

If the control data are not fulfilled after repeating, please contact your local distributor of R-Biopharm.

Do not report patient test results if the Controls do not meet above criteria for acceptability.

### 11.2. Spectrophotometric determination

The cut-off is determined by multiplying the mean value of the Negative Control by 4.

$$\text{cut-off} = 4 \times \text{absorbance value of the Negative Control}$$

Samples are considered **positive** if the absorbance value is higher than the determined cut-off.

Samples are considered **negative** if the absorbance value is lower than the determined cut-off.

Example:

Absorbance value Negative Control = 0.052  
Absorbance value Positive Control = 1.986  
Absorbance value sample 1 = 1.253

Cut-off calculation: cut-off =  $4 \times 0.052 = 0.208$

Result sample 1:  $1.253 > 0.208 = \text{positive}$

### 11.3. Visual Determination

A sample with an at least definite yellow color (+2) is considered **positive** for Legionella urinary antigen.

A sample with no yellow color or faint yellow color (+1) is considered **negative** for Legionella urinary antigen.

Please refer to the Visual Interpretation Card included in this kit.

Negative result = - = no yellow color  
+1 = faint yellow color

Positive result = +2 = definite yellow color  
+3 = bright yellow color  
+4 = intense yellow color

### 11.4. Results reporting

| Test result                 | Recommended report   |
|-----------------------------|--|
| <b>Positive</b> (> Cut-off) | presumptive positive for the presence of <i>L. pneumophila</i> serogroup 1 antigen in urine, suggesting current or past infection.   |
| <b>Negative</b> (< Cut-off) | presumptive negative for <i>L. pneumophila</i> serogroup 1 antigen in urine, suggesting no recent or current infection. Legionnaires' disease cannot be ruled out since other serogroups and species may also cause disease. |

## 12. Remarks about the test procedure and interpretation

The RIDASCREEN® Legionella assay detects *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine specimens. A relation between the absorbance value and the clinical relevance is not given. Assay results should always be interpreted in connection to the clinical diagnosis.

A positive result does not exclude the presence of other pathogens. A negative result does generally not exclude a Legionellosis infection.

Excretion of Legionella antigen in urine may vary depending on the individual patient and the stage of their disease. Some individuals have been shown to excrete antigen for an extended period of time, so a positive ELISA reaction may reflect a recent but not active infection.

Early treatment with appropriate antibiotics may also decrease antigen excretion in some individuals. Antigen excretion may begin as early as 3 days after onset of symptoms and persist for up to 1 year afterwards.

## 13. Clinical results

### 13.1. Expected values

266 randomly selected, presumed negative, uncharacterized urine specimens were tested using the RIDASCREEN® Legionella ELISA. The specimens were from four reference laboratories and included both fresh and frozen samples. 263 specimens tested negative for Legionella urinary antigen. The three presumed negative specimens tested low positive. The overall accuracy was 98.9 %.

| O.D. value<br>450 nm | 0,000-0,099  | 0,100-0,149 | 0,150-0,199 | 0,200-0,249 | 0,250-0,299 | > 0,299                         |
|----------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| number of<br>samples | 250<br>(94%) | 7<br>(2,6%) | 4<br>(1,5%) | 1<br>(0,4%) | 1<br>(0,4%) | 3<br>(1,1%)<br>(false positive) |

### 13.2. Sensitivity and Specificity

The performance of the RIDASCREEN® Legionella ELISA was evaluated in a clinical study by a leading infectious disease reference laboratory. This was a retrospective study on a panel of clinically well-characterized urine specimens. During the study, 234 urine specimens were tested with both the RIDASCREEN® Legionella ELISA and a commercial Legionella Urinary Antigen

EIA. This trial consisted of urine specimens from 94 *Legionella pneumophila* serogroup 1 culture-positive individuals, and 140 culture-negative individuals (including non-*Legionella* pneumonia, bacteremia, miscellaneous pulmonary diseases, and urinary tract infections). The performance of the RIDASCREEN® *Legionella* ELISA and the commercial LUA ELISA against culture results are presented below:

|  | <b>Culture (+)*<br/>n=94</b> | <b>Culture (-)**<br/>n=140</b> |
|--|------------------------------|--------------------------------|
| <b>RIDASCREEN® <i>Legionella</i> ELISA for LUA (+) n=104</b> | 89                           | 15                             |
| <b>RIDASCREEN® <i>Legionella</i> ELISA for LUA (-) n=130</b> | 5                            | 125                            |
| <b>Other EIA-Test for LUA (+) n=105</b>                      | 82                           | 23                             |
| <b>Other EIA-Test for LUA (-) n=129</b>                      | 12                           | 117                            |

\* Positive respiratory culture for *Legionella pneumophila* serogroup 1 (n=94)

\*\* Negative respiratory, blood or urine culture for *Legionella pneumophila* serogroup 1 (n=140)  
total n=234

The performance characteristics for the RIDASCREEN® *Legionella* ELISA Test from this data set are as follows:

Sensitivity = 89/94 = 94.7 % (95% Confidence interval = 90.1 – 99.2%)

Specificity = 125/140 = 89.3 % (95% Confidence interval = 84.2 – 94.4%)

Accuracy = 214/234 = 91.4 % (95% Confidence interval = 84.2 – 94.4%)

A second, prospective, clinical trial correctly identified as negative 127 freshly obtained urine specimens from non-*Legionella* patients with lower respiratory infections, sepsis, or urinary tract infections and abnormal urine specimens.

|  | <b>Culture (+)*<br/>n=0</b> | <b>Culture (-)**<br/>n=127</b> |
|--|-----------------------------|--------------------------------|
| <b>RIDASCREEN® <i>Legionella</i> ELISA for LUA (+) n=0</b>   | 0                           | 0                              |
| <b>RIDASCREEN® <i>Legionella</i> ELISA for LUA (-) n=127</b> | 0                           | 127                            |

\* Positive respiratory culture for *Legionella pneumophila* serogroup 1 (n=0)

\*\* Negative respiratory, blood or urine culture for *Legionella pneumophila* serogroup 1 (n=127)  
total n=127

### 13.3. Cross reactivity

In the clinical trial, of the 140 frozen Legionella-negative specimens, 50 had pneumonia (non-Legionella), 25 were bacteremic (non-Legionella), 15 had other pulmonary conditions, and 50 had urinary tract infection. Of the 15 specimens that produced a false positive result, 14 were from patients with bacteremia (*Streptococcus pneumoniae*), and one patient had a urinary tract infection (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*). However, in a second clinical trial for specificity using freshly obtained urine specimens, none of the patients with sepsis or pneumonia (23), none of the patients with a positive urine culture (25) and none of the patients with urinary tract infection (9) produced a false positive result.

### 13.4. Precision

The Intra-Assay Variation of the RIDASCREEN® Legionella ELISA was determined on three urine specimens containing different antigen concentrations (negative, low positive, high positive). The urine specimens were run in 30 replicates on three kit lots. Each specimen was correctly identified as being positive or negative 98.5 % of the time.

| <b>sample</b> | <b>mean O.D. value</b> | <b>Standard Deviation</b> | <b>Coefficient of Variation (%)</b> |
|---------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| negative      | 0.08                   | 0.011                     | 13.8                                |
| low positive  | 0.34                   | 0.034                     | 10.0                                |
| high positive | 1.31                   | 0.100                     | 7.6                                 |

The Inter-Assay Variation of the RIDASCREEN® Legionella ELISA was determined using 8 urine specimens containing different antigen concentrations. Specimens were made by spiking a pool of normal human urines with heat extract from *Legionella pneumophila* at concentrations that produced low positive (B, F), mid positive (A), high negative (D) and negative (G, H) O.D. results. These eight samples were masked and distributed to three sites for evaluation. Each site tested all eight spiked urine specimens in triplicate, using three different kit lots, on three different days. The specimens were correctly identified as being positive or negative in 100 % of the cases.

| <b>sample</b> | <b>mean O.D. value</b> | <b>Standard Deviation</b> | <b>Coefficient of Variation (%)</b> | <b>n =</b> |
|---------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------|
| A             | 1.72                   | 0.23                      | 13.31                               | 26         |
| B             | 1.07                   | 0.16                      | 14.79                               | 26         |
| C             | 2.89                   | 0.27                      | 9.42                                | 21*        |
| D             | 0.15                   | 0.02                      | 16.12                               | 26         |
| E             | 2.65                   | 0.32                      | 12.19                               | 25*        |
| F             | 0.74                   | 0.13                      | 17.18                               | 26         |
| G             | 0.08                   | 0.01                      | 16.18                               | 26         |
| H             | 0.09                   | 0.02                      | 21.48                               | 26         |

\* Sample data was excluded from statistical analyses because O.D. value exceeded the threshold of plate reader instrument. Samples above threshold were considered positive for Legionella pneumophila serogroup 1 urinary antigen.

## Appendix

### Literature

1. Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W., Parkin W.E., Beecham H.J., Sharrar R.G., Harris J., Mallison G. F., Martin S.M., McDade J.E., Shepherd C.C., Brachman P.S., and The Field Investigation Team. 1977. Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 29:1189-1197.
2. Stout, J.E., Yu. V.L., 1977. Legionellosis. *N. Eng. J. Med.* 337:682-687.
3. Kohler, R.B., Wilde III C., Johnson W., Joly J., Wheat L.J., Baker R., and Missett M. 1988. Immunologic diversity among serogroup 1 *Legionella pneumophila* urinary antigens demonstrated by monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 26:2059-2063.
4. Kohler, R.B. Winn W.C., Jr., and Wheat L.J. 1984. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* 20:605-607.
5. Berdal, B.P., Farshy C.E., and Feeley J.C. 1979. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *J. Clin. Microbiol.* 9:575-578.
6. Tilton, R.C. 1979. Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Intern. Med.* 90:697-698.
7. Kohler, R.B., Zimmerman S.E., Wilson E., Allen S.D., Edelstein P.H., Wheat L.J., and White A. 1981. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' Disease. *Ann. Intern. Med.* 94:601-605.
8. Bibb, W.F. P.M. Arnow, Thacker L., and McKinney R.M. 1984. Detection of soluble *Legionella pneumophila* antigens in serum and urine specimens by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 20:478-482.
9. Tang, P.W., and Toma S.. 1986. Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Legionella* soluble antigens. *J. Clin. Microbiol.* 24:556-558.