

Legiolert*



06-0005740-09

IDEXX



IDX 33/06 – 06/19
WATER ANALYSIS METHODS
<http://nf-validation.afnor.org>

The method Legiolert*/Quanti-Tray* Legiolert for water analysis is granted NF Validation by AFNOR Certification as an alternative method to the standards ISO 11731 and NF T90-431 for enumeration of *Legionella pneumophila* in drinking water and industrial water, under the Certificate number: IDX 33/06-06/19. For more information about end of validity, please refer to the certificate NF Validation on the website mentioned above.

La méthode Legiolert*/Quanti-Tray* Legiolert pour le contrôle des eaux est certifiée NF Validation par AFNOR Certification comme méthode alternative aux normes NF EN ISO 11731 et NF T90-431 pour le dénombrement des *Legionella pneumophila* dans les eaux de consommation humaine et les eaux industrielles sous le n° d'attestation: IDX 33/06-06/19. La date de fin de validité de la certification NF Validation est précisée sur l'attestation, disponible auprès d'IDEXX ou d'AFNOR Certification.

IDEXX

IDEXX Laboratories, Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092 USA
idexx.com/water

For Technical Support, please call:

North/South America: +1 207 556 4496/+1 800 321 0207

Europe: +00800 4339 9111

UK: +44 (0) 1638 676800

China: +86 21 61279528

Japan: +03 5301 6800

Australia: +1300 443 399

Italy: +39 055 208450

Legiolert® Test Kit

Introduction

Legiolert is a test that detects *Legionella pneumophila* in water samples. This test is based on a bacterial enzyme detection technology that signals the presence of *Legionella pneumophila* through utilization of a substrate present in the Legiolert reagent. *Legionella pneumophila* cells grow rapidly and reproduce using the rich supply of amino acids, vitamins and other nutrients present in the Legiolert reagent. Actively growing strains of *Legionella pneumophila* use the added substrate to produce a brown color indicator. Legiolert detects *Legionella pneumophila* at 1 organism in 100 mL within 7 days.

Storage

Store at 2–25°C away from direct light and humidity.

Potable Water Sample Preparation (for use with environmental samples only)

10 mL Protocol

1. Add 90 mL of sterile diluent (e.g., deionized water, phosphate/Butterfield's buffer, or 0.1% peptone) to a sterile vessel without sodium thiosulfate.
2. Add 10 mL water sample.
3. Bring sample to room temperature.
4. Add contents of Legiolert blister pack to sample.^{A,B}
5. Shake until contents are dissolved. Sample may remain cloudy.

100 mL Protocol¹

1. Collect 100 mL of sample in a sterile vessel.
2. Bring sample to room temperature.
3. Using a hardness dip strip (supplied as part of the Legiolert Supplement kit²), follow the manufacturer's instructions to determine if your sample has low or high hardness. Consider 0-2 pads positive as low; 3-4 pads positive as high.
4. Add corresponding supplement (supplied as part of the supplement kit) as follows: Briefly agitate the supplement vessel immediately prior to use, then for low hardness samples add 0.33 mL and for high hardness samples add 1.0 mL.
5. Add contents of Legiolert blister pack to sample.^{A,B}
6. Shake until contents are dissolved. Sample may remain cloudy.

Nonpotable Water Sample Preparation (for use with environmental samples only)

0.1 mL Protocol

1. Add 100 mL of sterile diluent (e.g., deionized water, phosphate/Butterfield's buffer, or 0.1% peptone) to a sterile vessel without sodium thiosulfate.
2. Add contents of Legiolert blister pack to vessel.^{A,B}
3. Shake until contents are dissolved. Solution may remain cloudy.
4. Add 0.2 mL of Legiolert Pretreatment into a sterile microtube.³
5. Add 0.2 mL of nonpotable water sample to the same microtube and mix well.
6. Incubate the microtube at room temperature for 60 seconds (± 5 seconds).
7. Mix the microtube contents and immediately transfer 0.2 mL to the vessel containing Legiolert and mix well.

1.0 mL Protocol¹

1. Add 100 mL of sterile diluent (e.g., deionized water, phosphate/Butterfield's buffer, or 0.1% peptone) to a sterile vessel without sodium thiosulfate.
2. Add contents of Legiolert blister pack to vessel.^{A,B}
3. Shake until contents are dissolved. Solution may remain cloudy.
4. Add 2.0 mL of Legiolert Pretreatment into a sterile tube.³
5. Add 2.0 mL of nonpotable water sample to the same tube and mix well.
6. Incubate the tube at room temperature for 60 seconds (± 5 seconds).
7. Mix the tube contents and immediately transfer 2.0 mL to the vessel containing Legiolert and mix well.

Quanti-Tray® Enumeration Procedure

For Quality Control (QC) and Proficiency Test (PT) samples only:

1. Add contents of Legiolert blister pack to sample.^{A,B}
2. Shake until contents are dissolved. Sample may remain cloudy.

For all test samples:

3. Pour sample/reagent mixture into a Quanti-Tray/Legiolert tray.^C Tap or flick the tray to remove air bubbles.^D
4. Immediately seal tray in an IDEXX Quanti-Tray Sealer PLUS.
5. Incubate the sealed trays:
 - i. For all potable water or QC and PT samples, incubate at $39 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 7 days.
 - ii. For all nonpotable water incubate at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 7 days.
6. Quanti-Tray/Legiolert must be incubated paper side down with the wells facing up in an environment that will minimize Quanti-Tray water loss (either in high humidity or in an enclosure that traps moisture). Stack trays in alternating directions for added stability.^E Do not remove trays completely from incubator prior to final read.
7. Read results according to the Result Interpretation table below. Count the number of positive wells and refer to the Legiolert MPN table provided with the trays to obtain a Most Probable Number. Multiply results by the dilution factor for the final MPN, if applicable.



Result Interpretation

Appearance

Any brown color (with or without turbidity)

Any turbidity (with or without any brown color change)

No brown color change and no turbidity

Result

Positive for *Legionella pneumophila*

Positive for *Legionella pneumophila*

Negative for *Legionella pneumophila*

- Legiolert quantitative results are definitive at 7 days. In addition, positive wells observed before 7 days and negative wells observed after 7 days are also valid.
- Turbidity alone indicates growth of *Legionella pneumophila* when the indicator may not develop as quickly or strongly.

Procedural Notes

- For comparison, an incubated sterile diluent blank containing Legiolert reagent (negative control) can be used when interpreting results.
- Legiolert is a primary water test. Legiolert performance characteristics do not apply to samples altered by pre-enrichment or concentration.
- Aseptic technique should always be followed when using Legiolert. Dispose of materials in accordance with Good Laboratory Practices.

Quality Control Procedures

Note: Quality control procedures must be carried out in the absence of sodium thiosulfate.

1. One of the following quality control procedures is recommended for each lot of Legiolert:

A. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*:¹ *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*.

B. For each of the American Type Culture Collection (ATCC)³ or World Data Centre for Microorganisms (WDCM)⁶ bacterial strains:

- i. Target organisms: *Legionella pneumophila* ATCC 33152/WDCM 00107 and/or ATCC 33156/WDCM 00180; streak the culture onto BCYE and incubate at 35°C for 48–72 hours.
- ii. Non-target organism: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212/WDCM 00087; streak onto blood agar plate and incubate at 35°C for 18–24 hours.
- iii. For each bacterial strain inoculate a sterile vessel containing 100 mL of sterile diluent (e.g., deionized water, phosphate/Butterfield's buffer, or 0.1% peptone) with 10^2 to 10^3 cfu for target organisms or 10^3 to 10^4 cfu for non-target organisms.

2. Follow the Quanti-Tray Enumeration Procedure above.

3. Results should match the Result Interpretation table above.

Note: IDEXX internal quality control testing is performed in accordance with ISO 11133:2014. Quality Control Certificates are available at idexx.com/water.

¹ AFNOR Certification NF Validation covers the potable 100 mL sample protocol and nonpotable 1.0 mL sample protocol.

² Legiolert Supplement kit, WLGT-SUP, 98-0005745-00

³ Legiolert Pretreatment, WLGT-PRE, 98-0007740-00

⁴ IDEXX-QC *Legionella pneumophila*, UN3373-WQC-LP 98-0009287-00

⁵ ATCC American Type Culture Collection 1-800-636-6597 • atcc.org

⁶ WDCM World Data Centre for Microorganisms • wdcm.org

^{*} Legiolert and Quanti-Tray are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.

Patent information: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Kit de test Legiolert*

Introduction

Legiolert est un test qui détecte *Legionella pneumophila* dans des échantillons d'eau. Ce test est basé sur une technologie de détection d'une enzyme bactérienne qui indique la présence de *Legionella pneumophila* grâce à l'utilisation d'un substrat présent dans le réactif Legiolert. Les cellules de *Legionella pneumophila* ont une croissance rapide et se reproduisent au moyen du milieu enrichi en acides aminés, vitamines et autres nutriments présents dans le réactif Legiolert. Les souches de *Legionella pneumophila* en phase de croissance active utilisent le substrat ajouté pour produire un indicateur de couleur brun. Legiolert détecte *Legionella pneumophila* à partir de 1 micro-organisme dans un échantillon de 100 ml en 7 jours.

Conservation

À conserver entre 2–25°C, à l'abri de la lumière directe et de l'humidité.

Préparation de l'échantillon d'eau potable (utiliser uniquement avec des échantillons environnementaux)

Protocole 10 ml

1. Ajouter 90 ml de diluant stérile (p. ex., eau désionisée, tampon phosphate/Butterfield, ou eau peptonée à 0,1%) dans un récipient stérile sans thiosulfate de sodium.
2. Ajouter 10 ml d'un échantillon d'eau.
3. Laisser l'échantillon revenir à température ambiante.
4. Agiter le contenu d'une dose Legiolert à l'échantillon.^{A,B}
5. Agiter jusqu'à dissolution complète du contenu. L'échantillon peut rester trouble.

Protocole 100 ml¹

1. Recueillir 100 ml d'un échantillon dans un flacon stérile.
2. Laisser l'échantillon revenir à température ambiante.
3. En utilisant une bandelette de test pour la dureté de l'eau (fournie dans le kit du supplément Legiolert), suivez les instructions du fabricant pour déterminer si la dureté de votre échantillon est faible ou élevée. Considérez que 0 à 2 carré(s) positif(s) constitue(nt) une faible dureté, et que 3 ou 4 carrés positifs constituent une dureté élevée.
4. Ajouter un supplément approprié (fourni dans le kit du supplément) de la manière suivante: agiter brièvement le récipient de supplément immédiatement avant utilisation, puis, pour les échantillons de dureté faible, ajouter 0,33 ml et pour les échantillons de dureté élevée, ajouter 1,0 ml.
5. Ajouter le contenu d'une dose Legiolert à l'échantillon.^{A,B}
6. Agiter jusqu'à dissolution complète du contenu. L'échantillon peut rester trouble.

Préparation de l'échantillon d'eau non potable (utiliser uniquement avec des échantillons environnementaux)

Protocole 0,1 ml

1. Ajouter 100 ml de diluant stérile (p. ex., eau désionisée, tampon phosphate/Butterfield, ou eau peptonée à 0,1%) dans un récipient stérile sans thiosulfate de sodium.
2. Ajouter le contenu d'une dose Legiolert dans le récipient.^{A,B}
3. Agiter jusqu'à dissolution complète du contenu. La solution peut rester trouble.
4. Ajouter 0,2 ml du prétraitement Legiolert dans un microtube stérile.³
5. Ajouter 0,2 ml de l'échantillon d'eau non potable au même microtube et bien mélanger.
6. Incuber le microtube à température ambiante pendant 60 secondes (± 5 secondes).
7. Mélanger le contenu du microtube, transférer immédiatement 0,2 ml au flacon contenant Legiolert et bien mélanger.

Protocole 1,0 ml¹

1. Ajouter 100 ml de diluant stérile (p. ex., eau désionisée, tampon phosphate/Butterfield, ou eau peptonée à 0,1%) dans un récipient stérile sans thiosulfate de sodium.
2. Ajouter le contenu d'une dose Legiolert dans le récipient.^{A,B}
3. Agiter jusqu'à dissolution complète du contenu. La solution peut rester trouble.
4. Ajouter 2,0 ml du prétraitement Legiolert dans un tube stérile.³
5. Ajouter 2,0 ml de l'échantillon d'eau non potable au même tube et bien mélanger.
6. Incuber le tube à température ambiante pendant 60 secondes (± 5 secondes).
7. Mélanger le contenu du tube, transférer immédiatement 2,0 ml au flacon contenant Legiolert et bien mélanger.

Procédure de numération Quanti-Tray[®]

Pour les échantillons destinés au contrôle qualité (CQ) et aux essais interlaboratoires (EI) uniquement:

1. Ajouter le contenu d'une dose Legiolert à l'échantillon.^{A,B}
2. Agiter jusqu'à dissolution complète du contenu. L'échantillon peut rester trouble.

Pour tous les échantillons à tester:

3. Distribuer le mélange échantillon/réactif dans un Quanti-Tray/Legiolert.^C Tapoter ou donner de légers coups sur le Quanti-Tray pour éliminer les bulles d'air.⁹
4. Fermer hermétiquement le Quanti-Tray immédiatement dans une scelleuse IDEXX Quanti-Tray Sealer PLUS.
5. Incuber les Quanti-Tray scellés:
 - i. Pour tous les échantillons d'eau potable ou les échantillons CQ et EI, incuber à $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pendant 7 jours.
 - ii. Pour tous les échantillons d'eau non potable, incuber à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pendant 7 jours.
6. Quanti-Tray/Legiolert doit être incubé côté papier vers le bas avec les puits orientés vers le haut, dans un environnement qui minimisera la perte d'eau de Quanti-Tray (soit dans une humidité élevée, soit dans un récipient qui emprisonne l'humidité). Empiler les Quanti-Tray en alternant le sens pour plus de stabilité.⁶ Ne retirez pas complètement les plateaux de l'incubateur avant la lecture finale.
7. Interpréter les résultats en se référant à la table d'interprétation des résultats ci-dessous. Compter le nombre de puits positifs et se référer à la table NPP Legiolert fournie avec les Quanti-Tray pour obtenir le Nombre le plus probable (NPP). Multiplier les résultats par le facteur de dilution pour obtenir le NPP final, s'il y a lieu.



Interprétation des résultats

Aspect	Résultats
Toute couleur marron (avec ou sans turbidité)	Positif pour <i>Legionella pneumophila</i>
Toute turbidité (avec ou sans changement de couleur marron)	Positif pour <i>Legionella pneumophila</i>
Aucun changement de couleur marron et aucune turbidité	Négatif pour <i>Legionella pneumophila</i>

- Les résultats quantitatifs de Legiolert sont définitifs au bout de 7 jours. En outre, des puits positifs observés avant 7 jours et des puits négatifs observés après 7 jours sont également valables.
- La seule présence d'un trouble indique la croissance de *Legionella pneumophila*, dans les cas éventuels où l'indicateur ne se développe pas de manière aussi rapide ou intense.

Remarques concernant la procédure

- À titre de comparaison, un blanc constitué de diluant stérile incubé contenant un réactif Legiolert (contrôle négatif) peut être utilisé lors de l'interprétation des résultats.
- Legiolert est un premier test sur l'eau. Les caractéristiques de performance de Legiolert ne s'appliquent pas à des échantillons modifiés par un pré-enrichissement ou une concentration.
- Une technique aseptique doit toujours être suivie lors de l'utilisation de Legiolert. Éliminer les matériaux conformément aux Bonnes pratiques de laboratoire.

Procédures de contrôle de la qualité

Remarque: Les procédures de contrôle qualité doivent être effectuées en l'absence de thiosulfate de sodium.

1. L'une des procédures suivantes de contrôle qualité est recommandée pour chaque lot de Legiolert:
 - A. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*⁴: *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*.
 - B. Pour chacune des souches bactériennes de la collection américaine (American Type Culture Collection, ATCC)⁵ ou du Centre mondial de données sur les micro-organismes (World Data Centre for Microorganisms, WDCM)⁶:
 - i. Organismes cibles: *Legionella pneumophila* ATCC 33152/WDCM 00107 et/ou ATCC 33156/WDCM 00180; ensemencer la culture sur une gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract, extrait de levure de charbon tamponnée) et incuber à 35°C pendant 48 à 72 heures.
 - ii. Organisme non cible: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212/WDCM 00087; ensemencer sur une gélose agar au sang et incuber à 35°C pendant 18 à 24 heures
 - iii. Pour chaque souche bactérienne, inoculer un récipient stérile correctement contenant 100 ml de diluant stérile avec (p. ex., eau désionisée, tampon phosphate/Butterfield, ou eau peptonée à 0,1%) 10^7 à 10^8 UFC pour les organismes cibles ou avec 10^6 à 10^7 UFC pour les organismes non cibles.
2. Suivre la procédure de numération Quanti-Tray ci-dessus.
3. Les résultats doivent correspondre à la table d'interprétation des résultats ci-dessus.

Remarque: Les tests de contrôle de la qualité internes d>IDEXX sont effectués conformément à la norme ISO 11133:2014. Les certificats de contrôle qualité sont disponibles à l'adresse idexx.com/water.

1. AFNOR Certification NIF Validation s'applique au protocole d'échantillon d'eau potable de 100 ml et au protocole d'échantillon d'eau non potable de 1,0 ml.
2. Kit du supplément Legiolert, WLGT-SUP 98-0005745-00
3. Prétraitement Legiolert, WLGT-PRE, 98-0007740-00
4. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*, UN3373-WOC-LP-98-0009287-00
5. Collection américaine (American Type Culture Collection, ATCC) 1-800-638-6597 • atcc.org
6. Centre mondial de données sur les microorganismes (World Data Centre for Microorganisms, WDCM) • wdcn.org

*Legiolert et Quanti-Tray sont des marques ou des marques déposées de la société IDEXX Laboratories, Inc. ou de ses sociétés affiliées aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Informations sur les brevets: idexx.com/patents.
© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

Kit para la prueba Legiolert*

Kit para la prueba Legiolert*

Legiolert es una prueba que detecta la *Legionella pneumophila* en muestras de agua. Esta prueba se basa en tecnología de detección de enzimas bacterianas que señala la presencia de *Legionella pneumophila* mediante la utilización de un sustrato presente en el reactivo de Legiolert. Las células de *Legionella pneumophila* crecen y se multiplican con rapidez debido al gran aporte de aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes en el reactivo de Legiolert. Las cepas de *Legionella pneumophila* en crecimiento activo utilizan el sustrato añadido para producir un indicador de color marrón. Legiolert detecta *Legionella pneumophila* en un organismo en 100 ml en 7 días.

Almacenamiento

Conservar a una temperatura de entre 2–25°C, lejos de la luz directa y la humedad.

Preparación de muestras de agua potable (solo para uso con muestras ambientales)

10 ml Protocolo

- Añada 90 ml de diluyente estéril (p. ej., agua desionizada, tampón de fosfato/de Butterfield o 0,1% de peptona) en un recipiente estéril sin tiosulfato sódico.
- Añada la muestra de agua de 10 ml.
- Lleve la muestra a temperatura ambiente.
- Añada el contenido del paquete del blíster de Legiolert a la muestra.^{A, B}
- Agite hasta que se disuelva el contenido. La muestra puede permanecer turbia.

100 ml Protocolo*

- Recoja 100 ml de muestra en un recipiente estéril.
- Lleve la muestra a temperatura ambiente.
- Utilizando una tira reactiva para la dureza (suministrada como parte del kit del suplemento Legiolert*), siga las instrucciones del fabricante para determinar si la muestra es de baja o alta dureza. Considere un resultado positivo en 0-2 almohadillas como baja dureza, y un resultado positivo en 3-4 almohadillas como alta dureza.
- Añada el suplemento correspondiente (suministrado como parte del kit de suplemento) según se indica a continuación: Agite brevemente el recipiente del suplemento justo antes de usarlo; después, para muestras de dureza baja añada 0,33 ml y para muestras de dureza alta añada 1,0 ml.
- Añada el contenido del paquete del blíster de Legiolert a la muestra.^{A, B}
- Agite hasta que se disuelva el contenido. La muestra puede permanecer turbia.

Preparación de muestras de agua no potable (solo para uso con muestras ambientales)

0,1 ml Protocolo

- Añada 100 ml de diluyente estéril (p. ej., agua desionizada, tampón de fosfato/de Butterfield o 0,1% de peptona) en un recipiente estéril sin tiosulfato sódico.
- Añada el contenido del paquete del blíster de Legiolert al recipiente.^{A, B}
- Agite hasta que se disuelva el contenido. La solución puede mantenerse turbia.
- Añada 0,2 ml de Pretratamiento Legiolert en un microtubo estéril.³
- Añada 0,2 ml de la muestra de agua no potable en el mismo microtubo y mezcle bien.
- Incube el microtubo a temperatura ambiente durante 60 segundos (± 5 segundos).
- Mezcle el contenido del microtubo y transfiera inmediatamente 0,2 ml al recipiente que contiene Legiolert y mezcle bien.

1,0 ml Protocolo*

- Añada 100 ml de diluyente estéril (p. ej., agua desionizada, tampón de fosfato/de Butterfield o 0,1% de peptona) en un recipiente estéril sin tiosulfato sódico.
- Añada el contenido del paquete del blíster de Legiolert al recipiente.^{A, B}
- Agite hasta que se disuelva el contenido. La solución puede mantenerse turbia.
- Añada 2,0 ml de Pretratamiento Legiolert en un tubo estéril.³
- Añada 2,0 ml de la muestra de agua no potable en el mismo tubo y mezcle bien.
- Incube el tubo a temperatura ambiente durante 60 segundos (± 5 segundos).
- Mezcle el contenido del tubo y transfiera inmediatamente 2,0 ml al recipiente que contiene Legiolert y mezcle bien.

Procedimiento de enumeración de Quanti-Tray*

Solamente para muestras de control de calidad (Quality Control, QC) y de prueba de aptitud (Proficiency Test, PT):

- Añada el contenido del paquete del blíster de Legiolert a la muestra.^{A, B}
- Agite hasta que se disuelva el contenido. La muestra puede permanecer turbia.

Para todas las muestras de prueba:

- Vierta la mezcla de la muestra/el reactivo en una bandeja de Quanti-Tray/Legiolert.^C Golpee o palmee la bandeja para eliminar las burbujas de aire.^D
- Selle inmediatamente la bandeja en un sellador IDEXX Quanti-Tray Sealer PLUS.
- Incube las bandejas selladas:
 - Para todas las muestras de agua potable o QC y PT, incube a $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 7 días.
 - Para las muestras de agua no potable, incube a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 7 días.
- Quanti-Tray/Legiolert se debe incubar con el papel hacia abajo y los pocillos hacia arriba en un ambiente que reduzca al mínimo la pérdida de agua de Quanti-Tray (con humedad alta o en un recipiente que atrape la humedad). Apile las bandejas en direcciones alternas para una mayor estabilidad.^E No extraiga completamente las bandejas de la incubadora antes de la lectura final.
- Lea los resultados de acuerdo con la tabla de interpretación de resultados que aparece a continuación. Cuente el número de pocillos positivos y consulte la tabla de NMP de Legiolert que se proporciona con las bandejas para obtener un número más probable. Multiplique los resultados por el factor de dilución para hallar el NMP final, si procede.



Interpretación del resultado

Aspecto

Cualquier coloración marrón (con o sin turbidez)

Resultados

Positivo para *Legionella pneumophila*

Cualquier turbidez (con o sin cualquier cambio en la coloración marrón)

Positivo para *Legionella pneumophila*

Sin cambios en la coloración marrón y sin turbidez

Negativo para *Legionella pneumophila*

- Los resultados cuantitativos de Legiolert son definitivos en 7 días. Además, los pocillos observados como positivos antes de los 7 días y los pocillos observados como negativos después de los 7 días también se pueden considerar válidos.
- La turbiedad por sí sola indica crecimiento de *Legionella pneumophila* cuando el indicador no puede desarrollarse de una manera tan rápida o intensa.

Notas del procedimiento

- Para las comparaciones, puede utilizarse diluyente estéril incubado blanco que contenga reactivo Legiolert (control negativo) al interpretar los resultados.
- Legiolert es una prueba primaria de agua. Las características del rendimiento de Legiolert no se aplican a las muestras alteradas mediante enriquecimiento previo o concentración.
- Siempre deben seguirse técnicas asépticas al utilizar Legiolert. Deseche los materiales de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

Procedimientos de control de calidad

Nota: Los procedimientos de control de calidad necesitan llevarse a cabo sin que haya tiosulfato sódico.

- Se recomienda utilizar uno de los siguientes procedimientos de control de calidad para cada lote de Legiolert:

A. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*: *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*.

B. Para cepas bacterianas según la Colección de Cultivos Tipo Estadounidense (American Type Culture Collection, ATCC)⁵ o el Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (World Data Centre for Microorganisms, WDCM)⁶:

i. Organismos diana: *Legionella pneumophila* ATCC 33152/WDCM 00107 y/o ATCC 33156/WDCM 00180; extienda el cultivo en agar BCYE e incube a 35°C durante entre 48 y 72 horas.

ii. Organismo no diana: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212/WDCM 00087; extienda en una placa de agar sangre e incube a 35°C durante entre 18 y 24 horas.

iii. Para cada cepa bacteriana, inocule un recipiente estéril que contenga 100 ml de diluyente estéril (p. ej., agua desionizada, tampón de fosfato/de Butterfield o 0,1% de peptona) con entre 10² y 10³ UFC para organismos diana o entre 10³ y 10⁴ UFC para organismos no diana.

- Siga el procedimiento de enumeración Quanti-Tray mencionado anteriormente.

- Los resultados deben coincidir con los de la tabla de interpretación de resultados anterior.

Nota: Las pruebas de control de calidad interna de IDEXX se realizan según la ISO 11133:2014. Los certificados de control de calidad se encuentran disponibles en idex.com/water.

1. AFNOR Certification NF Validation cubre el protocolo de la muestra 100 ml de agua potable y el protocolo de la muestra de 1,0 ml de agua no potable.

2. Kit de suplemento Legiolert, WLGT-SUP, 98-0005745-00

3. Pretratamiento Legiolert, WLGT-PRE, 98-0007740-00

4. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*, UN3373-WQC-LP 98-0009287-00

5. Colección de Cultivos Tipo Estadounidense (American Type Culture Collection, ATCC) 1-800-638-6597 • atcc.org

6. Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (World Data Centre for Microorganisms, WDCM) • wdcm.org

*Legiolert y Quanti-Tray son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de IDEXX Laboratories, Inc. o sus empresas filiales en Estados Unidos y/o en otros países.

Información de la patente: idex.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

Kit de ensaio Legiolert*

Introdução

Legiolert é um ensaio que detecta a *Legionella pneumophila* em amostras de água. Esse ensaio é baseado na tecnologia de detecção de enzimas bacterianas que sinalizam a presença da *Legionella pneumophila* através da utilização de um substrato presente no reagente do Legiolert. As células da *Legionella pneumophila* crescem rapidamente e se reproduzem usando o suprimento rico em aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes presentes no reagente do Legiolert. Cepas da *Legionella pneumophila* em crescimento ativo usam o substrato adicionado para produzir um indicador de cor marrom. O Legiolert detecta a *Legionella pneumophila* em 1 organismo com uma amostra de 100 ml de até 7 dias.

Armazenamento

Armazene entre 2–25°C, longe da luz e da umidade direta.

Preparação de amostra de água potável (somente para uso com amostras ambientais)

10 ml Protocolo

- Adicione 90 ml de diluente estéril (p. ex., água deionizada, tampão fosfato/de Butterfield ou peptona a 0,1%) em um recipiente estéril sem tiosulfato de sódio.
- Adicione 10 ml de amostra de água.
- Mantenha a amostra em temperatura ambiente.
- Adicione o conteúdo das cartelas Legiolert à amostra.^{A,B}
- Agite até que o conteúdo se dissolva. A amostra pode ficar turva.

100 ml Protocolo¹

- Colete 100 ml de amostra em um recipiente estéril.
- Mantenha a amostra em temperatura ambiente.
- Usando uma tira de teste de dureza (fornecida como parte do kit de suplemento Legiolert¹), siga as instruções do fabricante para determinar se a sua amostra possui dureza baixa ou alta. Considere 0–2 pads positivos como dureza baixa e 3–4 pads positivos como dureza alta.
- Adicione o suplemento correspondente (fornecido como parte do kit de suplemento) como segue: Agite rapidamente o recipiente do suplemento imediatamente antes de usá-lo; em seguida, para as amostras de dureza baixa adicione 0,33 ml, e para as amostras de dureza alta adicione 1,0 ml.
- Adicione o conteúdo das cartelas Legiolert à amostra.^{A,B}
- Agite até que o conteúdo se dissolva. A amostra pode ficar turva.

Preparação de amostra de água não potável (somente para uso com amostras ambientais)

0.1 ml Protocolo

- Adicione 100 ml de diluente estéril (p. ex., água deionizada, tampão fosfato/de Butterfield ou peptona a 0,1%) em um recipiente estéril sem tiosulfato de sódio.
- Adicione o conteúdo das cartelas Legiolert à amostra.^{A,B}
- Agite até que o conteúdo se dissolva. A solução pode permanecer turva.
- Adicione 0,2 ml de Pré-tratamento Legiolert em um microtubo estéril.³
- Adicione 0,2 ml da amostra de água não potável ao mesmo microtubo e misture bem.
- Incube o microtubo em temperatura ambiente por 60 segundos (± 5 segundos).
- Misture o conteúdo do microtubo, transfira imediatamente 0,2 ml do mesmo para o recipiente contendo Legiolert e misture bem.

1.0 ml Protocolo¹

- Adicione 100 ml de diluente estéril (p. ex., água deionizada, tampão fosfato/de Butterfield ou peptona a 0,1%) em um recipiente estéril sem tiosulfato de sódio.
- Adicione o conteúdo das cartelas Legiolert à amostra.^{A,B}
- Agite até que o conteúdo se dissolva. A solução pode permanecer turva.
- Adicione 2,0 ml de Pré-tratamento Legiolert em um tubo estéril.³
- Adicione 2,0 ml da amostra de água não potável ao mesmo tubo e misture bem.
- Incube o tubo em temperatura ambiente por 60 segundos (± 5 segundos).
- Misture o conteúdo do tubo, transfira imediatamente 2,0 ml do mesmo para o recipiente contendo Legiolert e misture bem.

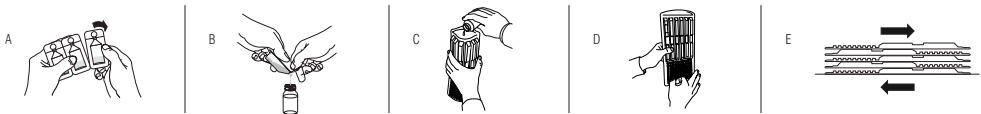
Procedimento de enumeração do Quanti-Tray[®]

Apenas para amostras de controle de qualidade (CQ) e teste de proficiência (TP):

- Adicione o conteúdo das cartelas Legiolert à amostra.^{A,B}
- Agite até que o conteúdo se dissolva. A amostra pode ficar turva.

Para todas as amostras de teste:

- Pingue a mistura da amostra/reagente em uma placa Quanti-Tray/Legiolert.⁵ Bata levemente a cartela para retirar as bolhas de ar.⁶
- Sele a cartela imediatamente em uma seladora IDEXX Quanti-Tray Sealer PLUS.
- Incube as cartelas seladas:
 - Para todas as amostras de água potável ou amostras de CQ e TP, incube a $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 7 dias.
 - Para todas as amostras de água não potável, incube a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 7 dias.
- Quanti-Tray/Legiolert deve ser incubado com o lado de papel virado para baixo e os poços virados para cima em um ambiente que diminua a perda de água do Quanti-Tray (tanto em umidade elevada como em um recipiente que retenha a umidade). Empilhe as cartelas em sentidos alternados para aumentar a estabilidade.⁵ Não retire completamente as bandejas da incubadora antes da leitura final.
- Leia os resultados de acordo com a Tabela de interpretação de resultados abaixo. Conte o número de cavidades positivas e consulte a Tabela MPN Legiolert fornecida juntamente às cartelas para obter o número mais provável. Multiplique os resultados pelo fator de diluição para obter o MPN final, se aplicável.



Interpretação dos resultados

Aparência

Qualquer coloração marrom (com ou sem turbidez)
Qualquer turbidez (com ou sem alteração de coloração marrom)
Nenhuma alteração de coloração marrom e sem turbidez

Resultados

Positivo para *Legionella pneumophila*
Positivo para *Legionella pneumophila*
Negativo para *Legionella pneumophila*

- Os resultados quantitativos de Legiolert são definitivos em 7 dias. Além disso, cavidades positivas observadas antes de 7 dias e cavidades negativas observadas após 7 dias também são válidos.
- Turbidez isolada pode indicar crescimento de *Legionella pneumophila* em situações em que o indicador não se desenvolve tão rápida ou fortemente.

Observações procedimentais

- Como forma de comparação, pode-se usar um controle de diluente estéril incubado contendo reagente Legiolert (controle negativo) para a interpretação dos resultados.
- Legiolert é um ensaio baseado primordialmente em água. As características de desempenho do Legiolert não se aplicam a amostras alteradas por pré-enriquecimento ou concentração.
- Deve-se usar sempre técnicas assépticas ao usar o Legiolert. Descarte de materiais de acordo com as Boas práticas de laboratório.

Procedimentos de controle de qualidade

Observação: Os procedimentos de controle de qualidade precisam ser realizados na ausência de tiosulfato de sódio.

- Recomenda-se um dos seguintes procedimentos de controle de qualidade para cada lote de Legiolert:

- IDEXX-QC *Legionella pneumophila*⁴: *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*.
- Para cada cepa bacteriana de Coleta de cultura do tipo americano (American Type Culture Collection, ATCC)⁵ ou do Centro mundial de dados de microrganismos (World Data Centre for Microorganisms, WDCM)⁶:
 - Organismos-alvo: *Legionella pneumophila* ATCC 33152/WDCM 00107 e/ou ATCC 33156/WDCM 00180; espalhe a cultura em ágar de extrato de leveduras com carvão tamponado (Buffered Charcoal Yeast Extract, BCYE) e incube a 35°C por 48–72 horas.
 - Organismo não classificado como alvo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212/WDCM 00087; espalhe a cultura na lâmina de ágar-sangue e incube a 35°C por 18–24 horas.
 - Para cada cepa bacteriana, inocule um recipiente estéril contendo 100 ml de diluente estéril (p. ex., água deionizada, tampão fosfato/de Butterfield ou peptona a 0,1%) com 10^4 a 10^6 cfu para organismos-alvo ou 10^3 a 10^6 cfu para organismos não classificados como alvo.

- Siga o Procedimento de enumeração do Quanti-Tray acima.

- Os resultados devem coincidir com a Tabela de interpretação de resultados acima.

Observação: O teste de controle de qualidade interno da IDEXX é realizado de acordo com a norma ISO 11133:2014. Os certificados de controle de qualidade estão disponíveis no idexx.com/water.

1. AFNOR Certification NF Validation abrange o protocolo de amostra para 100 ml de água potável e o protocolo de amostra para 1,0 ml de água não potável.
2. Kit de suplemento Legiolert, WLGT-SUP 98-0005745-00
3. Pré-tratamento Legiolert, WLGT-PRE, 98-0007740-00
4. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*, UN3373-WQC-LP 98-0009287-00
5. Coleta de cultura do tipo americano (American Type Culture Collection, ATCC) 1-800-638-6597 • atcc.org
6. Centro mundial de dados para microrganismos (World Data Centre for Microorganisms, WDCM) • wdcm.org

*Legiolert e Quanti-Tray são marcas registradas ou marcas comerciais da IDEXX Laboratories, Inc. ou suas afiliadas nos Estados Unidos e/ou em outros países. Informações sobre patente: idexx.com/patents.

Legiolert® Test Kit

Einführung

Legiolert ist ein Test zum Nachweis von *Legionella pneumophila* in Wasserproben. Dieser Test basiert auf einer bakteriellen Enzymdetektionstechnik, die die Gegenwart von *Legionella pneumophila* mit Hilfe eines Substrats im Legiolert-Reagenz signalisiert. Die *Legionella pneumophila*-Zellen wachsen schnell und reproduzieren sich, indem sie das große Angebot an Aminosäuren, Vitaminen und anderen Nährstoffen im Legiolert-Reagenz nutzen. Aktiv wachsende *Legionella pneumophila*-Stämme produzieren mit dem zugefügten Substrat einen braunen Indikator. Legiolert weist *Legionella pneumophila* bei 1 Organismus in einer 100-ml-Probe innerhalb von 7 Tagen nach.

Lagerung

Bei 2–25°C und vor Licht und Feuchtigkeit geschützt lagern.

Trinkwasserprobenvorbereitung (nur für Umweltproben zu nutzen)

10 ml Protokoll

- 90 ml steriles Verdünnungsmittel (z. B., entionisiertes Wasser, Phosphatpuffer, Butterfield-Puffer oder 0,1%iges Pepton) in ein steriles Gefäß geben ohne Natriumthiosulfat.
- Eine 10-ml-Wasserprobe hinzugeben.
- Probe auf Raumtemperatur bringen.
- Inhalt des Legiolert-Blisterpacks zur Probe geben.^{A,B}
- Schütteln, bis der Inhalt aufgelöst ist. Die Probe kann trüb bleiben.

100 ml Protokoll^I

- 100 ml der Probe in ein steriles Gefäß geben.
- Probe auf Raumtemperatur bringen.
- Folgen Sie den Herstelleranweisungen, um mithilfe eines Teststreifens zum Eintauchen (im Lieferumfang des Legiolert Ergänzungsmittel-Kits enthalten) den Härtegrad der Wasserprobe zu ermitteln. Stufen Sie Pads mit 0–2-positiv als gering; Pads mit 3–4-positiv als hoch ein.
- Entsprechendes Ergänzungsmittel (im Lieferumfang des Ergänzungsmittel-Kits enthalten) wie folgt hinzugeben: Das Gefäß mit dem Ergänzungsmittel unmittelbar vor der Verwendung kurz schütteln und anschließend bei Proben mit niedrigem Härtegrad 0,33 ml und bei Proben mit hohem Härtegrad 1,0 ml Ergänzungsmittel hinzufügen.
- Inhalt des Legiolert-Blisterpacks zur Probe geben.^{A,B}
- Schütteln, bis der Inhalt aufgelöst ist. Die Probe kann trüb bleiben.

Brauchwasserprobenvorbereitung (nur für Umweltproben zu nutzen)

0.1 ml Protokoll

- 100 ml steriles Verdünnungsmittel (z. B., entionisiertes Wasser, Phosphatpuffer, Butterfield-Puffer oder 0,1%iges Pepton) in ein steriles Gefäß geben ohne Natriumthiosulfat.
- Inhalt des Legiolert-Blisterpacks in das Gefäß geben.^{A,B}
- Schütteln, bis der Inhalt aufgelöst ist. Die Lösung kann trüb bleiben.
- 0,2 ml Legiolert Vorbehandlung in ein steriles Mikroröhrchen geben.³
- Eine Probe von 0,2 ml nicht trinkbaren Wasser in dasselbe Mikroröhrchen geben und gut mischen.
- Das Mikroröhrchen bei Raumtemperatur 60 Sekunden (± 5 Sekunden) lang inkubieren.
- Den Inhalt des Mikroröhrchens gut mischen und sofort 0,2 ml in das Gefäß mit Legiolert geben und gut mischen.

1.0 ml Protokoll^I

- 100 ml steriles Verdünnungsmittel (z. B., entionisiertes Wasser, Phosphatpuffer, Butterfield-Puffer oder 0,1%iges Pepton) in ein steriles Gefäß geben ohne Natriumthiosulfat.
- Inhalt des Legiolert-Blisterpacks in das Gefäß geben.^{A,B}
- Schütteln, bis der Inhalt aufgelöst ist. Die Lösung kann trüb bleiben.
- 2,0 ml Legiolert Vorbehandlung in ein steriles Röhrchen geben.³
- Eine Probe von 2,0 ml nicht trinkbaren Wasser in dasselbe Röhrchen geben und gut mischen.
- Das Röhrchen bei Raumtemperatur 60 Sekunden (± 5 Sekunden) lang inkubieren.
- Den Inhalt des Röhrchens gut mischen und sofort 2,0 ml in das Gefäß mit Legiolert geben und gut mischen.

Quanti-Tray®-Auszahlverfahren

Nur für Qualitätskontrollproben (QK) und Eignungsprüfungsproben (EP):

- Inhalt des Legiolert-Blisterpacks zur Probe geben.^{A,B}
- Schütteln, bis der Inhalt aufgelöst ist. Die Probe kann trüb bleiben.

Für alle Testproben:

- Die Probe-Reagenz-Mischung in ein Quanti-Tray/Legiolert-Tray geben.^C Gegen das Tray klopfen oder schnippen, um Luftbläschen zu entfernen.³
- Das Tray sofort in einem IDEXX Quanti-Tray Sealer PLUS versiegeln.
- Die versiegelten Trays inkubieren:
 - Alle Trinkwasser-, QK- und EP-Proben bei $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 7 Tage lang inkubieren.
 - Alle Nicht-Trinkwasser-Proben bei $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 7 Tage lang inkubieren.
- Quanti-Tray/Legiolert muss mit der Papierseite nach unten und den Vertiefungen nach oben in einer Umgebung inkubiert werden, die den Wasserverlust von Quanti-Tray minimiert (entweder bei hoher Luftfeuchtigkeit oder in einem Behälter, das keine Feuchtigkeit entweichen lässt). Für zusätzliche Stabilität die Trays in wechselnder Ausrichtung stapeln.⁴ Entfernen Sie vor Durchführung der abschließenden Kontrolle die Behälter nicht vollständig aus dem Inkubator.
- Die Ergebnisse mit Hilfe der nachfolgenden Tabelle zur Ergebnisauswertung ablesen. Die Anzahl der positiven Vertiefungen zählen und mit der im Lieferumfang der Trays enthaltenen Legiolert-MPN-Tabelle vergleichen, um eine wahrscheinlichste Zahl (most probable number, MPN) zu bestimmen. Ergebnisse ggf. mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren, um die endgültige MPN zu erhalten.



Ergebnisauswertung

Aussehen

Jeglicher braune Farbton (mit oder ohne Trübung)

Jegliche Trübung (mit oder ohne Braun-Farbwechsel)

Kein Braun-Farbwechsel und keine Trübung

Ergebnis

Positiv für *Legionella pneumophila*

Positiv für *Legionella pneumophila*

Negativ für *Legionella pneumophila*

- Quantitative Legiolert Ergebnisse sind nach 7 Tagen definitiv. Darüber hinaus sind auch positiven Vertiefungen gültig, die vor dem Ablauf von 7 Tagen beobachtet werden, sowie negative Vertiefungen, die nach dem Ablauf von 7 Tagen beobachtet werden.
- Eine Trübung allein weist auf das Wachstum von *Legionella pneumophila* hin, wenn sich der Indikator unter Umständen nicht so schnell oder stark entwickelt.

Verfahrenshinweise

- Zu Vergleichszwecken kann bei der Auswertung der Ergebnisse eine inkubierte Blindprobe mit sterilem Verdünnungsmittel und Legiolert-Reagenz (Negativkontrolle) verwendet werden.
- Legiolert ist ein Primärwassertest. Die Leistungsmerkmale von Legiolert gelten nicht für Proben, die durch Voranreicherung oder Konzentration verändert wurden.
- Bei der Verwendung von Legiolert sind immer aseptische Arbeitstechniken anzuwenden. Die Materialien sind gemäß der Guten Laborpraxis zu entsorgen.

Qualitätskontrollverfahren

Hinweis: Qualitätskontrollverfahren müssen bei Abwesenheit von Natriumthiosulfat angewandt werden.

- Eines der folgenden Qualitätskontrollverfahren wird für jede Legiolert-Charge empfohlen:

A. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*®: *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*.

B. Für jeden American Type Culture Collection (ATCC)⁵- oder World Data Centre for Microorganisms (WDCM)⁶-Bakterienstamm:

i. Zielorganismen: *Legionella pneumophila* ATCC 33152/WDCM 00107 und/oder ATCC 33156/WDCM 00180; die Kultur auf BCYE streichen und 48–72 Stunden lang bei 35°C inkubieren.

ii. Nicht-Zielorganismus: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212/WDCM 00087; auf eine Blutagarplatte streichen und 18–24 Stunden lang bei 35°C inkubieren.

iii. Für jeden Bakterienstamm ein steriles Gefäß mit 100 ml sterilem Verdünnungsmittel (z. B., entionisiertes Wasser, Phosphatpuffer, Butterfield-Puffer oder 0,1%iges Pepton) mit 10^6 bis 10^3 Kbe für Zielorganismen oder 10^3 bis 10^4 Kbe für Nicht-Zielorganismen inokulieren.

- Das oben beschriebene Quanti-Tray-Auszählverfahren befolgen.

- Die Ergebnisse sollten mit der Tabelle zur Ergebnisauswertung (siehe oben) übereinstimmen.

Hinweis: Die internen Qualitätskontrollprüfungen von IDEXX werden im Einklang mit ISO 11133:2014 durchgeführt. Qualitätskontrollzertifikate sind unter idexx.com/water erhältlich.

¹ Die AFNOR Certification NF Validation deckt das Protokoll für die 100ml Trinkwasserprobe und das Protokoll für die 1,0ml Brauchwasserprobe ab.

² Legiolert Ergänzungsmittel-Kit, WLGT-SUP, 98-0005745-00

³ Legiolert Vorbehandlung, WLGT-PRE, 98-0007740-00

⁴ IDEXX-QC *Legionella pneumophila*, UN3373-WQC-LP, 98-0009287-00

⁵ ATCC American Type Culture Collection 1-800-638-6597 • atcc.org

⁶ WDCM World Data Centre for Microorganisms • wdcm.org

^{*} Legiolert und Quanti-Tray sind Marken oder eingetragene Marken der IDEXX Laboratories Inc. oder ihrer angeschlossenen Unternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern.

Patentinformationen: idexx.com/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Kit per analisi Legiolert*

Introduzione

Legiolert è un test per la rilevazione di *Legionella pneumophila* in campioni di acqua. Questo test si basa su una tecnologia che rileva enzimi batterici per segnalare la presenza di *Legionella pneumophila* tramite l'utilizzo di un substrato presente nel reagente Legiolert. Le cellule di *Legionella pneumophila* crescono e si riproducono rapidamente grazie al ricco apporto di aminoacidi, vitamine e altri nutrienti presenti nel reagente Legiolert. Ceppi di *Legionella pneumophila* in intensa crescita utilizzano il substrato aggiuntivo per produrre un indicatore di color marrone. Legiolert rileva, entro 7 giorni, la *Legionella pneumophila* al livello di 1 organismo per campione di 100 ml.

Conservazione

Conservare a 2–25°C lontano da luce diretta e umidità.

Preparazione del campione d'acqua potabile (da utilizzare solo con campioni ambientali)

Protocollo 10 ml

1. Aggiungere 90 ml di diluente sterile (ad es., acqua deionizzata, tampone fosfato/di Butterfield o peptone allo 0,1%) a un recipiente sterile senza tiosolfato di sodio.
2. Aggiungere 10 ml di campione di acqua.
3. Consentire al campione di raggiungere la temperatura ambiente.
4. Aggiungere al campione il contenuto di una confezione blister Legiolert.^{A,B}
5. Agitare fino alla dissoluzione del contenuto. È possibile che il campione rimanga torbido.

Protocollo 100 ml¹

1. Raccogliere un campione di 100 ml in un recipiente sterile.
2. Consentire al campione di raggiungere la temperatura ambiente.
3. Utilizzando una striscia di cartina indicatrice di durezza (fornita con il kit del supplemento Legiolert²), seguire le istruzioni del produttore per determinare se il campione contiene acqua dura o soffice. Tenere presente che 0-2 caselle (pad) positive indicano acqua soffice; 3-4 caselle positive indicano acqua dura.
4. Aggiungere il supplemento corrispondente (fornito con il kit supplementare) come segue: Agitare brevemente il recipiente immediatamente prima dell'uso, quindi aggiungere 0,33 ml ai campioni di bassa durezza e 1,0 ml ai campioni di durezza elevata.
5. Aggiungere al campione il contenuto di una confezione blister Legiolert.^{A,B}
6. Agitare fino alla dissoluzione del contenuto. È possibile che il campione rimanga torbido.

Preparazione del campione d'acqua non potabile (da utilizzare solo con campioni ambientali)

Protocollo 0.1 ml

1. Aggiungere 100 ml di diluente sterile (ad es., acqua deionizzata, tampone fosfato/di Butterfield o peptone allo 0,1%) a un recipiente sterile senza tiosolfato di sodio.
2. Aggiungere al recipiente il contenuto di una confezione blister Legiolert.^{A,B}
3. Agitare fino alla dissoluzione del contenuto. La soluzione potrebbe rimanere torbida.
4. Aggiungere 0,2 ml di Legiolert Pretreatment a una microprovetta sterile.³
5. Aggiungere 0,2 ml del campione di acqua non potabile alla stessa microprovetta e mescolare bene.
6. Incubare la microprovetta a temperatura ambiente per 60 secondi (± 5 secondi).
7. Mescolare il contenuto della microprovetta e trasferire immediatamente 0,2 ml nel recipiente contenente Legiolert e mescolare bene.

Protocollo 1.0 ml¹

1. Aggiungere 100 ml di diluente sterile (ad es., acqua deionizzata, tampone fosfato/di Butterfield o peptone allo 0,1%) a un recipiente sterile senza tiosolfato di sodio.
2. Aggiungere al recipiente il contenuto di una confezione blister Legiolert.^{A,B}
3. Agitare fino alla dissoluzione del contenuto. La soluzione potrebbe rimanere torbida.
4. Aggiungere 2,0 ml di Legiolert Pretreatment a una provetta sterile.³
5. Aggiungere 2,0 ml del campione di acqua non potabile alla stessa provetta e mescolare bene.
6. Incubare la provetta a temperatura ambiente per 60 secondi (± 5 secondi).
7. Mescolare il contenuto della provetta e trasferire immediatamente 2,0 ml nel recipiente contenente Legiolert e mescolare bene.

Procedura di conteggio Quanti-Tray[®]

Solo per i campioni da utilizzare per il controllo qualità (Quality Control, QC) e le prove valutative (Proficiency Test, PT):

1. Aggiungere al campione il contenuto di una confezione blister Legiolert.^{A,B}
2. Agitare fino alla dissoluzione del contenuto. È possibile che il campione rimanga torbido.

Per tutti i campioni dei test:

3. Versare la miscela di campione/reagente nel vassoio Quanti-Tray/Legiolert.⁶ Tamburellare o picchiare sul vassoio per eliminare bolle d'aria.⁹
4. Sigillare immediatamente il vassoio con un IDDEX Quanti-Tray Sealer PLUS.
5. Incubare i vassoi sigillati:
 - i. Per tutti i campioni di acqua potabile o per QC e PT, incubare a $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 7 giorni.
 - ii. Per tutti i campioni di acqua non potabile, incubare $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 7 giorni.
6. Quanti-Tray/Legiolert deve essere incubato con il lato cartaceo rivolto verso il basso e i pozzetti rivolti verso l'alto in un ambiente che ridurrà al minimo la perdita d'acqua di Quanti-Tray (o in un ambiente con un'elevata percentuale di umidità o in un contenitore che trattiene l'umidità). Impilare i vassoi in direzioni alternate per migliorarne la stabilità.⁵ Non rimuovere completamente i vassoi dall'incubatore prima della lettura finale.
7. Leggere i risultati secondo la tabella di Interpretazione risultati qui sotto. Contare il numero di pozzetti positivi e fare riferimento alla tabella Legiolert MPN provvista con i vassoi, in modo da ottenere un Numero Più Probabile. Se pertinente, per il "Numero Più Probabile" (Most Probable Number, MPN) finale, moltiplicare i risultati per il fattore di diluizione.



Interpretazione risultati

Aspetto	Risultati
Qualunque colore marrone (con o senza torbidità)	Positivo alla <i>Legionella pneumophila</i>
Qualunque torbidità (con o senza cambiamento del colore marrone)	Positivo alla <i>Legionella pneumophila</i>
Nessun cambiamento del colore marrone e nessuna torbidità	Negativo alla <i>Legionella pneumophila</i>

- I risultati in analisi quantitativa con Legiolert sono definitivi al 7 giorno. Inoltre, pozzetti positivi osservati prima dei 7 giorni e pozzetti negativi osservati dopo i 7 giorni sono da ritenere altrettanto validi.
- La torbidità da sola è indicativa di crescita di *Legionella pneumophila* nei casi in cui l'indicatore potesse svilupparsi più lentamente o meno intensamente.

Note procedurali

- Per l'interpretazione, i risultati possono essere confrontati con un vuoto incubato con diluente sterile contenente il reagente Legiolert (controllo negativo).
- Legiolert è un'analisi primaria dell'acqua. Le caratteristiche di prestazioni di Legiolert non sono applicabili a campioni modificati da pre-aricchimento o che sono stati concentrati.
- Si devono sempre seguire tecniche asettiche nell'uso di Legiolert. Scartare i materiali secondo le Buone Prassi di Laboratorio.

Procedure controllo qualità

Nota: Le procedure di controllo qualità devono essere condotte in assenza di tiosolfato di sodio.

1. Per ciascun lotto di Legiolert si raccomanda una delle seguenti procedure di controllo qualità:

A. IDEX-QC *Legionella pneumophila*⁴: *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*.

B. Per ciascun ceppo della Collezione americana culture tipo (American Type Culture Collection, ATCC)⁵ o del Centro mondiale dati sui microorganismi (World Data Centre for Microorganisms, WDCM)⁶:

- i. Organismo mirato: *Legionella pneumophila* ATCC 33152/WDCM 00107 e/o ATCC 33156/WDCM 00180; strisciare la coltura su terreno BCYE e incubare a 35°C per 48–72 ore.
- ii. Organismo non-mirato: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212/WDCM 00087; strisciare su piastre di agar-sangue e incubare a 35°C per 18–24 ore.
- iii. Per ciascun ceppo batterico, inoculare un recipiente sterile contenente 100 ml di diluente sterile (ad es., acqua deionizzata, tampone fosfato/di Butterfield o peptone allo 0,1%) con da 10⁷ a 10⁹ UFC per gli organismi mirati o da 10⁸ a 10⁶ UFC per gli organismi non mirati.

2. Seguire la procedura di enumerazione Quanti-Tray di cui sopra.

3. I risultati dovrebbero corrispondere alla tabella di interpretazione dei risultati di cui sopra.

Nota: I test di controllo di qualità interni IDEXX sono condotti in conformità con ISO 11133:2014. I certificati di controllo qualità sono disponibili sul sito idexx.com/water.

¹ AFNOR Certification NF Validation indica il protocollo da 100ml per i campioni di acqua potabili e quello da 1.0ml il protocollo per i campioni di acqua non potabile.

² Legiolert Kit Supplementare, WLGT-SUP, 98-0005745-00

³ Legiolert Pre-trattamento, WLGT-PRE, 98-0007740-00

⁴ IDEXX-QC *Legionella pneumophila*, UN3373-WGC-LP, 98-0009287-00

⁵ ATCC American Type Culture Collection 1-800-638-6597 • atcc.org

⁶ WDCM World Data Centre for Microorganisms • wdcm.org

* Legiolert e Quanti-Tray sono marchi commerciali o marchi registrati di IDEXX Laboratories, Inc. o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri Paesi.

Informazioni brevetti: idexx.co/patents.

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti riservati.

Test Legiolert*

Wprowadzenie

Legiolert® to test wykrywający bakterie *Legionella pneumophila* w próbkach wody. Zastosowano w nim technologię wykrywania enzymu bakteryjnego wskazującego na obecność *Legionella pneumophila* poprzez użycie zawartego w odczynniku Legiolert substratu. Wykorzystując aminokwasy, witaminy i inne składniki odżywcze, których bogate źródło stanowi odczynnik Legiolert, komórki bakterii *Legionella pneumophila* szybko rosną i namnażają się. Aktywnie rosnące szczepy *Legionella pneumophila* - wykorzystując dodany substrat - powodują zabarwienie na kolor brązowy. Test Legiolert wykrywa od 1 bakterii *Legionella pneumophila* w 100ml w ciągu 7 dni.

Przechowywanie

Przechowywać w temperaturze 2–25°C, z dala od bezpośredniego światła i wilgoci.

Przygotowanie próbki wody pitnej (jedynie dla próbek środowiskowych)

Protokół 10 ml

1. Dodać 90 ml sterylnego rozcieńczalnika (np. wody odchlorowanej, wody dejonizowanej, buforu fosforanowego, buforu fosforanowego Butterfielda lub peptonu 0,1%) do sterylnego naczynia.
2. Dodać 10 ml próbki wody.
3. Doprowadzić próbkę do temperatury pokojowej.
4. Dodać zawartość blistrowego opakowania Legiolert do próbki.^{A,B}
5. Wstrząsać aż zawartość się rozpuści. Próbka może pozostać mętna.

Protokół 100 ml¹

1. Pobrać 100 ml próbki do sterylnego naczynia.
2. Doprowadzić próbkę do temperatury pokojowej.
3. Użyć paska do sprawdzania twardości wody (dostarczonego w zestawie pomocniczym Legiolert®) i zgodnie z instrukcjami producenta określić, czy próbka ma niską czy wysoką twardość. 0-2 dodatnie pola testowe należy uznać za twardość niską, a 3-4 pola dodatnie - za twardość wysoką.
4. Dodać odpowiedni odczynnik dodatkowy (dostarczony w zestawie pomocniczym) w następujący sposób: krótko potrząsnąć naczyniem bezpośrednio przed użyciem, a następnie do próbek o niskiej twardości dodać 0,33 ml, a do próbek o wysokiej twardości - 1,0 ml.
5. Dodać zawartość blistrowego opakowania Legiolert do próbki.^{A,B}
6. Potrząsać aż zawartość się rozpuści. Próbka może pozostać mętna.

Przygotowanie próbki wody niezdatnej do picia (jedynie dla próbek środowiskowych)

Protokół 0.1 ml

1. Dodać 100 ml sterylnego rozcieńczalnika (np. wody odchlorowanej, wody dejonizowanej, buforu fosforanowego, buforu fosforanowego Butterfielda lub peptonu 0,1%) do sterylnego naczynia.
2. Dodać zawartość blistrowego opakowania Legiolert do naczynia.^{A,B}
3. Wstrząsać aż zawartość się rozpuści. Roztwór może pozostać mętny.
4. Do sterylnej mikroprowbówki dodać 0,2 ml odczynnika Legiolert do wstępnego przygotowania.³
5. Do tej samej mikroprowbówki dodać 0,2 ml próbki wody niezdatnej do picia i dobrze wymieszać.
6. Mikroprowbówkę inkubować w temperaturze pokojowej przez 60 sekund (±5 sekund).
7. Zmieszać zawartość mikroprowbówki, niezwłocznie przenieść 0,2 ml do naczynia z odczynnikiem Legiolert i dobrze wymieszać.

Protokół 1.0 ml¹

1. Dodać 100 ml sterylnego rozcieńczalnika (np. wody odchlorowanej, wody dejonizowanej, buforu fosforanowego, buforu fosforanowego Butterfielda lub peptonu 0,1%) do sterylnego naczynia.
2. Dodać zawartość blistrowego opakowania Legiolert do naczynia.^{A,B}
3. Wstrząsać aż zawartość się rozpuści. Roztwór może pozostać mętny.
4. Do sterylnej probówki dodać 2 ml odczynnika Legiolert do wstępnego przygotowania.³
5. Do tej samej probówki dodać 2 ml próbki wody niezdatnej do picia i dobrze wymieszać.
6. Probówkę inkubować w temperaturze pokojowej przez 60 sekund (±5 sekund).
7. Zmieszać zawartość mikroprowbówki, niezwłocznie przenieść 2 ml do naczynia z odczynnikiem Legiolert i dobrze wymieszać.

Procedura wylizania liczby bakterii przy użyciu Quanti-Tray*

Tylko dla kontroli jakości (QC) i badań biegłości:

1. Dodać zawartość blistrowego opakowania Legiolert do próbki.^{A,B}
2. Wstrząsać aż zawartość się rozpuści. Próbka może pozostać mętna.

Dla wszystkich badanych próbek:

3. Wlać mieszaninę próbki i odczynnika do płytki Quanti-Tray/Legiolert.^C Lekko postukać w płytkę, aby usunąć pęcherzyki powietrza.^D
4. Płytkę niezwłocznie zgrzać w zgrzewarce IDEXX Quanti-Tray Sealer PLUS.
5. Zgrzane płytki poddać inkubacji:
 - i. próbki wody pitnej lub próbki do kontroli jakości i do badań biegłości inkubować w temperaturze 39±0,5°C przez 7 dni.
 - ii. próbki wody niezdatnej do picia inkubować w temperaturze 37±0,5°C przez 7 dni.
6. Płytką Quanti-Tray/Legiolert musi być inkubowana w wilgotnym środowisku, przy czym jej strona papierowa musi być skierowana ku dołowi, a dolki zwrócone ku górze. Płytki należy ułożyć w naprzemiennych kierunkach, aby zwiększyć stabilność.^E Nie wyjmować całkowicie tacek z inkubatora przed ostatecznym odczytem.
7. Odczytać wyniki zgodnie z zamieszczoną poniżej tabelą interpretacji wyników. Policzyc dolki dodatnie i odnieść się do tabeli Legiolert NPL dostarczonej wraz z płytkami, aby uzyskać najbardziej prawdopodobną liczbę (NPL). Aby uzyskać ostateczną NPL, pomnożyć wyniki przez współczynnik rozcieńczenia, jeśli ma to zastosowanie.



Interpretacja wyników

Wygląd

Każda zmiana zabarwienia na brązowe (ze zmętnieniem albo bez)

Wynik

Dodatni dla *Legionella pneumophila*

Każde zmętnienie (ze zmianą zabarwienia na brązowe albo bez)

Dodatni dla *Legionella pneumophila*

Brak zmiany zabarwienia na brązowe i brak zmętnienia

Ujemny dla *Legionella pneumophila*

- Ilościowe wyniki uzyskane przy użyciu testu Legiolert uznaje się za ostateczne po upływie 7 dni. Ważne są także dolki dodatnie uzyskane przed upływem 7 dni oraz dolki ujemne uzyskane po upływie 7 dni.
- Samo zmętnienie wskazuje na namnażanie się bakterii *Legionella pneumophila* przy braku szybkiego lub wyraźnego zabarwienia.

Uwagi dot. procedury

- Dla celów porównawczych przy interpretacji wyników można użyć sterylnej inkubowanej próby ślepej rozcieńczalnika zawierającej odczynnik Legiolert (kontrola ujemna).
- Legiolert to test do badania wody. Jego właściwości nie mają zastosowania do próbek zmienionych przez wstępne wzbogacenie lub sflęzienie.
- Przeprowadzając test Legiolert, należy zawsze stosować techniki aseptyczne. Materiałów należy się pozbywać zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.

Procedura kontroli jakości

Uwaga: W celu oznaczenia próbek do kontroli jakości i badań biegłości należy odnieść się do sekcji dot. procedury wylizania liczby bakterii Quanti-Tray zamieszczonej powyżej.

1. Dla każdej serii testu Legiolert zalecana jest jedna z poniższych procedur kontroli jakości:
 - A. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*: *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*.
 - B. Dla szczepów bakterijnych z American Type Culture Collection (ATCC)⁴ lub World Data Centre for Microorganisms (WDCM)⁶:
 - i. Organizmy celowe: *Legionella pneumophila* ATCC 33152/WDCM 00107 i/lub ATCC 33156/WDCM 00180 - wysiać hodowlę na podłożu BCYE i inkubować w temperaturze 35°C przez 48-72 godz.
 - ii. Organizm nie-celowy: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212/WDCM 00087 - wysiać na płytkę z agarem z krwią i inkubować w temperaturze 35°C przez 18–24 godz.
 - iii. Dla każdego ze szczepów bakteryjnych przeprowadzić inokulację w 100 ml sterylnego rozcieńczalnika zawartego w oznakowanym, sterylnym naczyniu, stosując od 10² do 10⁷ CFU w przypadku organizmów celowych lub od 10¹ do 10⁴ CFU w przypadku organizmów nie-celowych.
2. Postępować zgodnie z procedurą wylizania liczby bakterii Quanti-Tray opisaną powyżej.
3. Wyniki powinny być zgodne z tabelą interpretacji wyników zamieszczoną powyżej.

Uwaga: Wewnętrzna kontrola jakości IDEXX przeprowadzana jest zgodnie ze normą ISO 11133:2014. Certyfikaty jakości dostępne są na stronie idexx.com/water.

1. AFNOR Certification NF Validation obejmuje protokół dla wody pitnej 100ml i protokół dla wody niezdatnej do picia 1.0ml.
2. Legiolert Zestaw pomocniczy, WLGT-SUP, 98-0005745-00
3. Legiolert Odczynnik do wstępnego przygotowania, WLGT-PRE, 98-0007740-00
4. IDEXX-QC *Legionella pneumophila*, UN3373-WGC-LP, 98-0009287-00
5. ATCC American Type Culture Collection 1-800-638-6597 • atcc.org
6. WDCM World Data Centre for Microorganisms • wdcm.org

*Legiolert i Quanti-Tray są znakami towarowymi lub zarejestrowanymi znakami towarowymi spółki IDEXX Laboratories, Inc. lub jej oddziałów w Stanach Zjednoczonych i/lub innych krajach. Informacje o patentach: idexx.com/patents.