

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Legio



PROTCOLE D'ANALYSE LEGIO EZ-COUNT

INSTRUCTIONS FOR USE ANALYSIS PROTOCOL
LEGIO EZ-COUNT

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Legio



EZ-Count™

NOTICE

PROCOLE D'ANALYSE

DOMINIQUE DUBUSCHER SAS

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Sommaire

1.

Introduction p.6 à 7

- Technologie utilisée
- Recommandations pour une utilisation idéale

2.

Contenu du kit de réactifs Legio EZ-Count p.8

3.

Préparatifs avant analyse p.9 à 10

4.

Procédure étapes par étapes p.11

Étape A.....	p.11 à 12
Étape B.....	p.13
Étape C.....	p.14
Étape D.....	p.14
Étape E.....	p.15
Étape F.....	p.16
Étape G.....	p.17
Étape H.....	p.18
Étape I.....	p.19
Étape J.....	p.19
Étape K.....	p.20
Étape L.....	p.21
Étape M.....	p.21

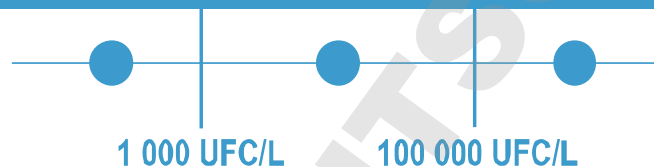
5.

Résultats p.22 à 23

Introduction

Legio EZ-Count* est une solution simple et rapide qui détecte exclusivement les bactéries *Legionella pneumophila* cultivables (au même titre que la procédure réglementaire NF T90-431) dans des échantillons d'Eaux de Tours Aéroréfrigérantes (TAR).

Legio EZ-Count permet d'identifier en 48 heures les échantillons d'eau de TAR contenant moins de 1 000 UFC/L, entre 1 000 et 100 000 UFC/L ou plus de 100 000 UFC/L de *L. pneumophila*.



Technologie utilisée

Cette solution utilise une technologie innovante brevetée** qui combine :

- (i) une mise en culture sur gélose sélective GVPC de l'échantillon à analyser,
- (ii) l'assimilation exclusivement par les *L. pneumophila* d'un sucre modifié,
- (iii) une révélation de ce sucre modifié présent après assimilation dans la partie O-antigénique du lipopolysaccharide des *L. pneumophila*, via une réaction basée sur de la chimie « click » permettant de réaliser une réaction colorimétrique enzymatique.

Recommandations pour une utilisation idéale

Bien lire le protocole avant d'effectuer l'analyse. En cas de doute, contacter le service support.

- Le protocole est sans danger en conditions normales d'utilisation. L'échantillon d'eau pouvant potentiellement contenir des *L. pneumophila*, il est recommandé de prendre les précautions d'usage tout au long de l'analyse.
- Éviter tout contact des réactifs avec la peau et les yeux ainsi que les éclaboussures.
- Ne pas laisser à la portée des enfants.

- Stocker le kit de réactifs **Legio EZ-Count** entre +4°C et +8°C (idéalement à +4°C) dès réception. Une exposition ponctuelle à température ambiante (notamment durant le transport, ...) n'est pas préjudiciable.
- Ne pas exposer à des températures inférieures à 0°C.
- Le kit de réactifs **Legio EZ-Count** est destiné à être utilisé avec les équipements suivant :
 - Équipement Terrain Multi-test
 - Rampe de filtration
- Bien lire la notice d'utilisation de l'équipement que vous avez choisi d'utiliser avant de commencer l'analyse.
- Le respect du protocole, des temps indiqués et de la Date Limite d'Utilisation du produit figurant sur la boîte garantit la performance du kit.
- Ne pas exposer les réactifs ou faire l'analyse au soleil.
- L'analyse doit être conduite rapidement après avoir fait votre prélèvement d'échantillon d'eau.
- L'échantillon d'eau ne doit pas être conservé au frais avant d'effectuer l'analyse.
- A l'issue de l'analyse, éliminer les déchets conformément aux bonnes pratiques de votre établissement.

**Legio EZ-Count est une marque déposée de la société Diamidex.*

***Identification of living Legionella pneumophila using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling. Mas Pons J, Dumont A, Sautejeau G, Fugier E, Baron A, Dukan S, Vauzeilles B. Angew Chem Int Ed Engl. 2014 Jan 27;53(5):1275-8.*

• **IMPORTANT**



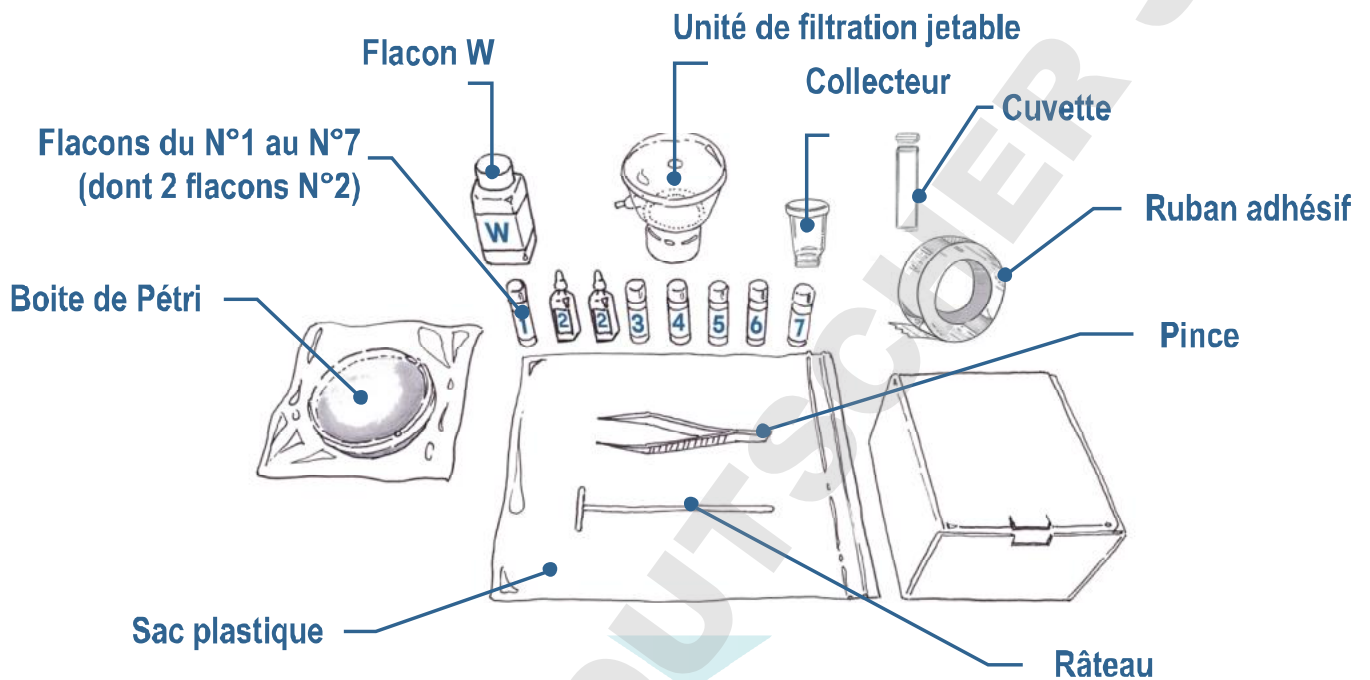
Utiliser ce kit uniquement pour des analyses environnementales d'Eaux de Tours Aéroréfrigérantes.

Pour une assistance technique, merci de contacter le service support.

Coordonnées au dos de la présente notice

Contenu du Kit de réactifs Legio EZ-Count

Carton contenant :



Chaque kit de réactifs **Legio EZ-Count** permet de réaliser 1 analyse, pour 1 échantillon d'eau de TAR.

Pour chaque nouvelle analyse, veuillez utiliser un nouveau kit de réactifs **Legio EZ-Count**, chaque kit contenant l'ensemble des consommables ci-dessus.

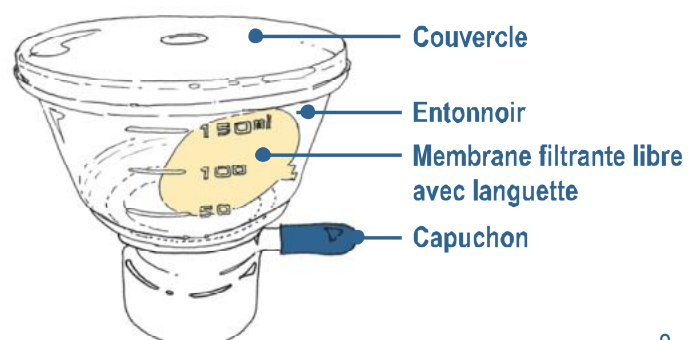
• IMPORTANT

A réception, stocker les kits de réactifs Legio EZ-Count au réfrigérateur (+4°C et +8°C). L'Unité de filtration jetable peut être stockée à part, dans un endroit propre à l'abri de la chaleur et de l'humidité.

Unité de filtration

L'Unité de Filtration jetable est un consommable non réutilisable, utilisé pour la 2ème partie du protocole.

Ce consommable est fourni avec chaque kit de réactifs **Legio EZ-Count**.



Préparatifs avant analyse

IMPORTANT



L'analyse doit être réalisée sur un plan de travail propre et horizontal.

Le protocole d'analyse comprend 3 parties :

Partie 1 : Préparation de l'échantillon.

Etape A à Etape E : Cette partie nécessitera 10 minutes environ de manipulations.

Incubation :

Etape F : Cette partie nécessitera 47 heures d'incubation. Veillez à prendre toutes les précautions d'usages indiquées dans la notice de l'équipement utilisé afin qu'aucune interruption du cycle d'incubation ne se produise, sous peine de compromettre les résultats de l'analyse. Assurez vous par ailleurs de pouvoir **poursuivre l'analyse dès la fin des 47 heures d'incubation.**

Partie 2 : Révélation et lecture du résultat.

Etape G à Etape M : Cette partie nécessitera 50 minutes de manipulations.

• IMPORTANT

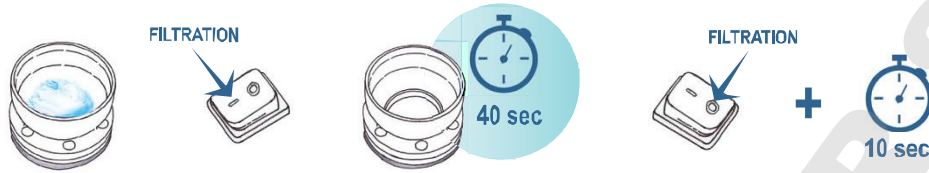


Veillez à bien planifier ces étapes en prenant en compte leur durée, afin de garantir les résultats de l'analyse.

[FILTRER] ou



NB : Dans la suite de ce protocole, le symbole **[FILTRER]** sera associé aux manipulations suivantes :



- Allumer la pompe à vide
- Attendre que le liquide soit complètement aspiré
- **Important** : Même s'il vous semble que le liquide a été complètement aspiré, la pompe doit rester en marche au minimum 40 secondes.
- Éteindre la pompe
- Une fois la pompe éteinte, attendre 10 secondes de plus avant de passer à l'étape suivante.

En effet, vous devez être certain que l'aspiration est bien terminée avant de verser un autre réactif. Si l'aspiration n'est pas complètement terminée, le réactif suivant, pourrait être aspiré avant d'avoir pu faire son effet.

Les manipulations pour allumer/éteindre la pompe sont spécifiques à l'équipement choisi pour faire les analyses. Merci de vous référer à la notice d'utilisation correspondante.



ATTENTION

Dans le cas d'un échantillon d'eau fortement chargé en impuretés, nous recommandons d'effectuer une préfiltration de votre échantillon à l'aide d'un filtre 10 μ m.

Si un problème de filtration est rencontré, vous référer au chapitre «dysfonctionnements» de la notice de l'équipement choisi.

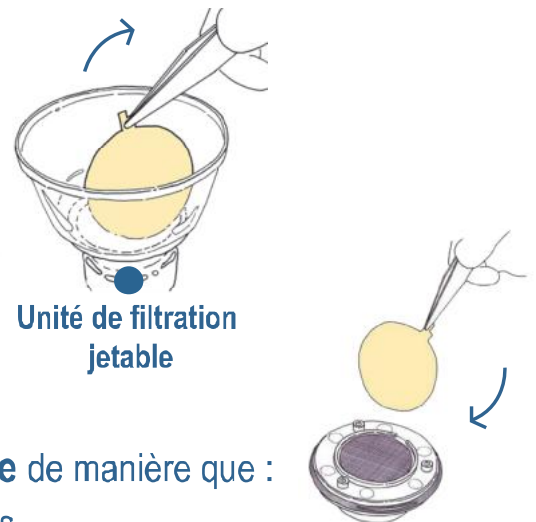
Procédure étapes par étapes

ÉTAPE A

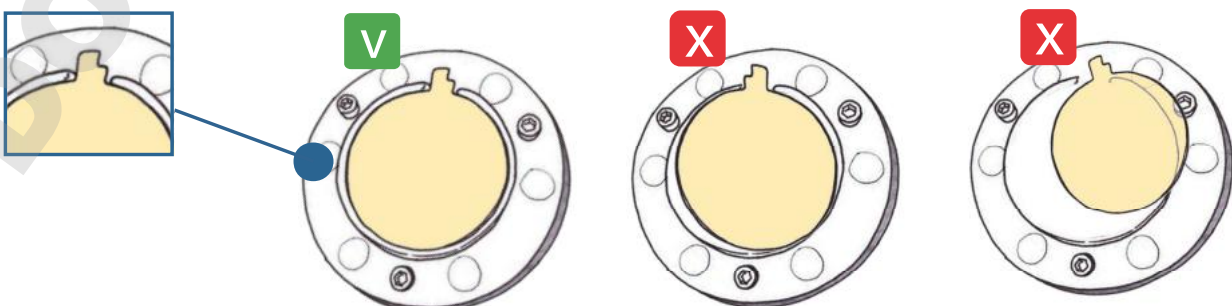
- Prendre le support membrane et l'entonnoir aimanté fourni avec l'équipement choisi pour effectuer l'analyse.
- Positionner le support membrane sur l'équipement.
- Sortir le kit de réactifs **Legio EZ-Count** du réfrigérateur.
- Sortir l'unité de filtration jetable de son sachet en maintenant en place son couvercle.

NB : Cette partie ne nécessitera pas l'usage de l'unité de filtration jetable, seulement de la membrane se situant à l'intérieur. L'unité de filtration jetable sera conservé pour la partie 2 du protocole.

- A l'aide de la pince, **saisir la membrane libre de l'unité de filtration jetable** par sa languette latérale.
- ➔ **Ne pas la saisir par un autre endroit car la pince risquerait d'endommager la membrane et donc de compromettre les résultats de l'analyse.**



- Positionner la membrane sur **le support membrane** de manière que :
 - Elle forme un « L » comme sur le schéma ci-dessous.
 - Elle soit parfaitement centrée sur le support membrane, dans l'emplacement prévu à cet effet.



• IMPORTANT



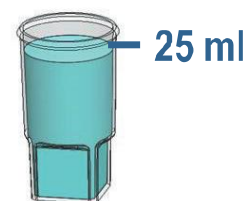
La membrane doit être centrée et posée en permanence sur la même face tout au long de l'analyse, sous peine de compromettre les résultats de l'analyse.

- Positionner l'entonnoir aimanté sur le support membrane. Veiller à ce que les aimants de l'entonnoir et du support membrane s'enclenchent correctement.



- Remettre le couvercle sur l'unité de filtration jetable et la ranger dans son sachet.

- Verser l'échantillon d'eau dans le collecteur jusqu'à ce que ce dernier soit rempli (le volume correspond à 25 ml, l'échantillon d'eau doit être à température ambiante).



- Si vous effectuez plusieurs analyses simultanément, veillez à utiliser un collecteur différent pour chacun de vos échantillons, sous peine de contaminer ces derniers et compromettre les résultats de vos analyses.
- Replacer ensuite le collecteur dans le kit de réactifs **Legio EZ-Count**, il sera de nouveau utilisé à la fin du protocole d'analyse.

[FILTRER]



ÉTAPE B



- La filtration étant terminée et la pompe à vide étant arrêtée, ouvrir avec précaution le flacon N°1 et verser la totalité de son contenu dans l'entonnoir.
- Reboucher le flacon N°1 et le jeter dans le sac plastique.
- Démarrer le minuteur pour 5 minutes.

Pendant ces 5 minutes, réaliser l'étape C.



ÉTAPE C



- Ouvrir le flacon N°2 (dosette) en inclinant son bouchon sur le côté jusqu'à ce qu'il casse.
- Ouvrir le flacon N°3.
- En appuyant sur le flacon N°2, verser 6 gouttes dans le flacon N°3.
- Reboucher le flacon N°3.



Conserver les flacons N°2 et N°3 à proximité.



- Après les 5 minutes :

[FILTRER]

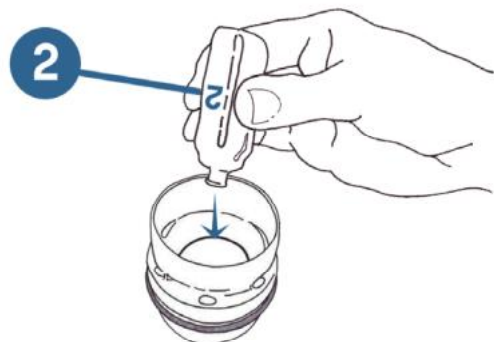


ÉTAPE D

- Vider le contenu du flacon N°2 au centre de l'entonnoir.

- Jeter le flacon N°2.

[FILTRER]



ÉTAPE E

a/



- Sortir la boîte de Pétri de son sachet. Une entaille sur le bord du sachet permet une ouverture facile.
- Retirer le couvercle de la boîte de Pétri.
- Ne pas toucher l'intérieur de la boîte de Pétri pour ne pas la contaminer.

b/



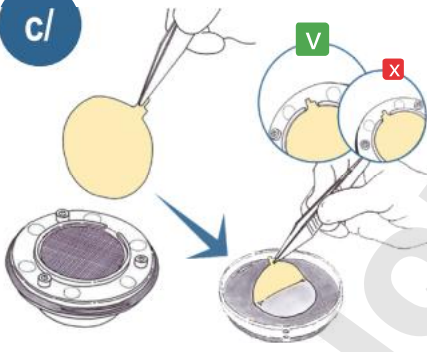
- Verser la totalité du flacon N°3 au centre de la boîte de Pétri.
- Ne pas étaler le liquide.

• **IMPORTANT**

Ne pas bouger la boîte de Pétri, le liquide déposé doit rester au centre.

- Enlever l'entonnoir aimanté.

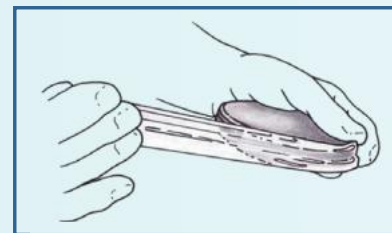
c/



- A l'aide de la pince, saisir par sa languette latérale la membrane libre située sur le support membrane.
- La déposer comme indiqué sur le schéma ci-contre.
- Déposer le bord de la membrane au bord de la goutte précédemment déposée au centre de la boîte de Pétri, de sorte que le liquide soit en contact avec toute la surface de la membrane.
- Assurez vous qu'il n'y ait pas de bulle sous la membrane.
- Avec la languette formant toujours un « L ».

d/

- Remettre le couvercle de la boîte de Pétri. Garder la boîte bien horizontale.
- Appliquer le ruban adhésif sur tout le pourtour en la boîte en faisant 2 tours.
- Conserver la pince pour la suite de l'analyse.
- **Retourner la boîte de Pétri de sorte que le couvercle se retrouve en dessous (face noire vers le haut).**



ÉTAPE F

Incuber la boîte de Pétri selon les instructions liées à l'équipement utilisé :

ÉQUIPEMENT	INCUBATION
Équipement terrain Multi-tests	Mode TAR
Incubateur laboratoire	45 minutes à 52°C puis 47 heures à 37°C

Remettre le kit de réactifs **Legio EZ-Count** au réfrigérateur.

→ **NETTOYER LE SUPPORT MEMBRANE ET L'ENTONNOIR AIMANTÉ COMME INDIQUÉ DANS LA NOTICE FOURNIE AVEC VOTRE ÉQUIPEMENT.** ←

• IMPORTANT



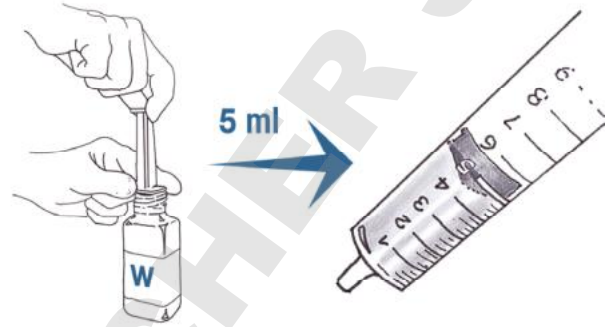
Noter le jour et l'heure du début d'incubation, et revenir après 47 heures pour procéder à la 2ème partie de l'analyse.



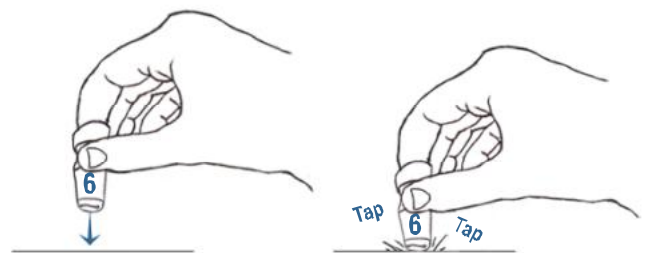
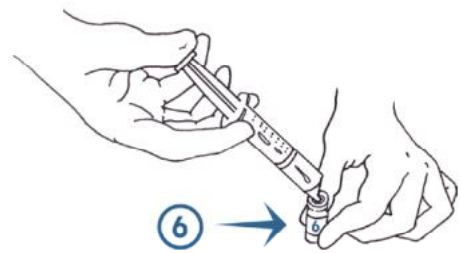
47H

ÉTAPE G

- Au bout de 47 heures, sortir le kit de réactifs **Legio EZ-Count** du réfrigérateur.
- Ouvrir le flacon N°6.
- Prélever 5ml du flacon W, à l'aide de la seringue fournie avec les Équipements (éviter la présence d'air dans la seringue).

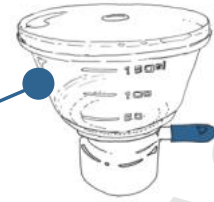


- **Transférer doucement ces 5 ml dans le flacon N°6.**
- Reboucher le flacon N°6.
- Tapoter le flacon sur le plan de travail, afin que le liquide passe bien sous la poudre.
- Repositionner le flacon N°6 dans le carton de consommables à son emplacement numéroté et laisser reposer jusqu'à l'étape K.

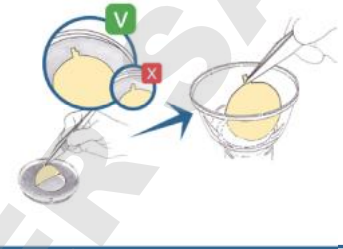


ÉTAPE H

- **MUNISSEZ- VOUS DE L'UNITÉ DE FILTRATION JETABLE.**
- Sortir la boîte de Pétri de l'incubateur.
- Placer l'unité de filtration jetable sur l'équipement que vous utilisez pour conduire l'analyse.
- Enlever le couvercle de l'unité de filtration jetable.
- Retirer le scotch et le couvercle de la boîte de Pétri.
- A l'aide de la pince, saisir la membrane libre par sa languette latérale et la déposer au centre de l'entonnoir.



a/



• IMPORTANT



A ce stade, et dans la plupart des cas, la membrane comportera peu (ou pas) d'éléments visibles à l'œil. Si vous remarquez de nombreuses tâches ou points sur la membrane, cela pourra indiquer que votre échantillon d'eau était très chargé en microorganismes, et empêcher le fonctionnement de la prochaine filtration. Si la filtration suivante ne fonctionne pas, veuillez vous reporter aux exemples présentés à la fin de cette notice.

• RAPPEL

Respecter le schéma ci-dessus : **la languette formant un « L »**. La membrane doit être parfaitement **centrée au fond de l'entonnoir**.

- Jeter la boîte de Pétri et la pince dans le sac plastique.
- Prélever **10 ml du flacon W** avec la seringue.
- Vider la seringue au centre de l'entonnoir.
- **Frotter (délicatement)** toute la surface de la membrane avec le râteau pendant **30 secondes**.
- Jeter le râteau dans le sac plastique.

[FILTRER]



- Prélever une seconde fois 10 ml du flacon W avec la seringue.

- Vider la seringue au centre de l'unité de filtration.

[FILTRER]



b/




c/



ÉTAPE I

a/



- La pompe étant arrêtée, bien vérifier que l'aiguille du manomètre est sur « 0 » (si votre équipement comporte un manomètre).
- Ouvrir le flacon N°4 et verser son contenu au centre de l'entonnoir.
- Respecter un temps d'attente de 5 minutes.
- Après les 5 minutes : **[FILTRER]** 

b/



- Prélever 10 ml du flacon W avec la seringue.
- Vider la seringue au centre de l'entonnoir.

[FILTRER] 

ÉTAPE J

a/

- **La pompe étant toujours arrêtée**, verser le contenu du flacon N°5 au centre de l'entonnoir.
- Démarrer le minuteur pour 1 minute.
- Reboucher et jeter le flacon N°5 dans le sac plastique.

Après 1 minute :

[FILTRER] 



b/

- Prélever 10 ml du flacon W avec la seringue.
- Vider la seringue au centre de l'entonnoir.

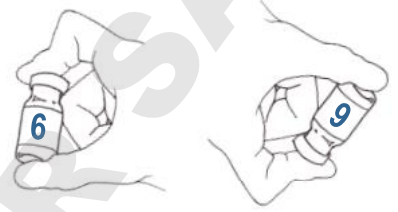
[FILTRER] 



ÉTAPE K

a/

- Reprendre le flacon N°6 et le secouer jusqu'à complète dissolution (la solution doit être homogène).



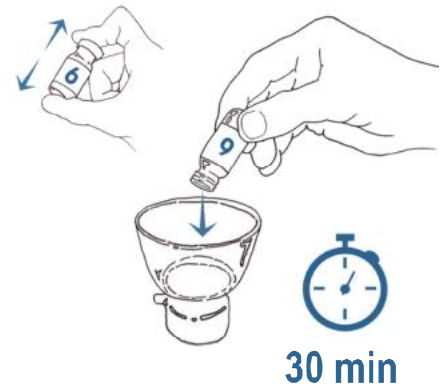
- ➔ Pour cela, bien maintenir son bouchon en place, le placer tête en bas puis le redresser plusieurs fois d'affilée.

- La pompe à vide étant arrêtée, verser le contenu du flacon N°6 au centre de l'entonnoir.

- Refermer l'unité de filtration jetable avec le couvercle.

- Respecter un temps d'attente de 30 minutes. Après ces 30 minutes :

[FILTRER]



b/

- Prélever 10 ml du flacon W avec la seringue.
- Vider doucement la seringue au centre de l'entonnoir.

[FILTRER]



- Prélever une seconde fois 10 ml du flacon W avec la seringue.

- Vider la seringue au centre de l'entonnoir.

(bis)

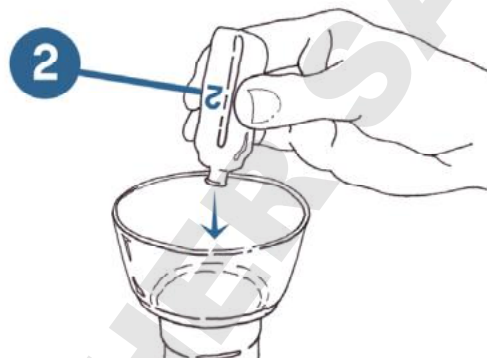
[FILTRER]



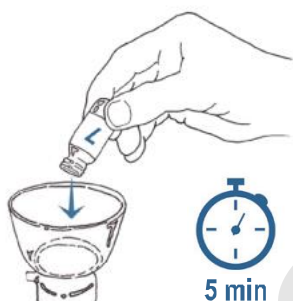
ÉTAPE L

- Verser le contenu du flacon N°2 restant (dosette) au centre de l'entonnoir.

[FILTRER]



ÉTAPE M



- Positionner le collecteur sous l'unité de filtration jetable conformément au type de matériel que vous utilisez pour effectuer l'analyse.
- La pompe à vide étant arrêtée, verser le contenu du flacon N°7 au centre de l'entonnoir.

- Remettre le couvercle de l'unité de filtration jetable.
- Respecter un temps d'attente de 5 minutes.

- Refermer et jeter le flacon N°7.

- Après ces 5 minutes :

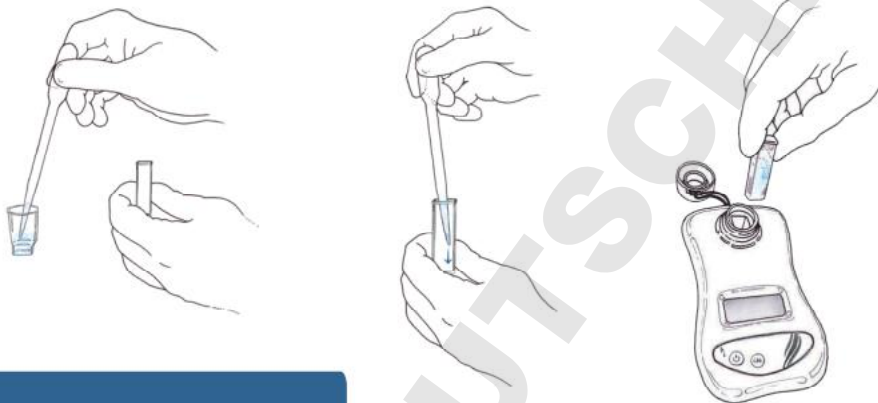
[FILTRER]



- Respecter un nouveau temps d'attente de 5 minutes.

RÉSULTATS

- Une fois les 5 minutes passées, récupérer le collecteur à l'aide de la pince, et transférer une partie du liquide du collecteur dans la cuvette à l'aide de la pipette poire fournie. La cuvette doit être remplie de plus de moitié pour permettre la lecture..
- Placer la cuvette dans le colorimètre et lire l'absorbance.



• IMPORTANT

La cuvette doit être placée dans un certain sens pour que la lecture d'absorbance puisse s'effectuer correctement. Merci de vous reporter à la notice d'utilisation du colorimètre fournie avec votre équipement.

- Si le chiffre affiché sur le colorimètre **est inférieur à 0,24 alors le résultat est NEGATIF** (l'échantillon d'eau testé contient moins de 1 000 UFC/L de *Legionella pneumophila*).
- Si le chiffre affiché **est entre 0,24 et 0,6 alors l'échantillon d'eau testé contient entre 1 000 UFC/L et 100 000 UFC/L** de *Legionella pneumophila*.
- Si le chiffre affiché **est supérieur à 0,6 alors l'échantillon d'eau testé contient au minimum 100 000 UFC/L** de *Legionella pneumophila*.

FIN DE L'ANALYSE, ENTRETIEN DE L'ÉQUIPEMENT

- Une fois l'analyse terminée, éliminer les déchets (sachet plastique contenant les flacons vides, unité de filtration jetable... et déchets liquides) conformément aux bonnes pratiques de votre établissement.
- Nettoyer les équipements conformément aux préconisations d'entretien détaillées dans les notices d'utilisation fournies avec chacun d'entre eux.
- La seringue doit être rincée à l'eau claire puis séchée avant d'être rangée dans votre équipement.

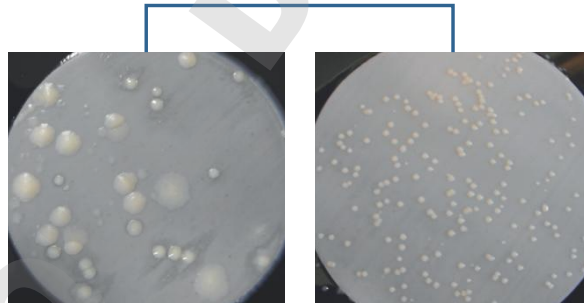
• IMPORTANT



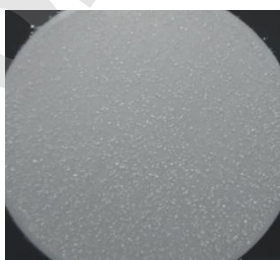
Aucun liquide ne doit rester à l'intérieur des équipements, qui doivent être

propres et secs avant d'être transportés et/ou rangés.

L'étape de filtration après incubation n'a pas fonctionné, la membrane présente un nombre important de tâches/points. Exemples de cas :



Présence d'une flore interférente trop importante pour interpréter la concentration en *Legionella pneumophila* de votre échantillon. Dans ce type de cas, la plupart des méthodes de détection et dénombrement de *Legionella pneumophila* donneront des résultats non interprétables.



ATTENTION

Votre échantillon comporte très probablement une quantité très importante de *Legionella pneumophila* (> 100 000 UFC/L).



DOMINIQUE DUTSCHER SAS

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Legio

 EZ-Count™

**INSTRUCTIONS FOR USE
ANALYSIS PROTOCOL**

DOMINIQUE DEBISCHER SAS

Summary

1.

Introduction p.28 to 29

- Technology used
- Recommendations for an optimal use

2.

Contents of the reagents kit Legio EZ-Count p.30

3.

Preparations before analyses p.31 to 32

4.

Step by step procedure p.33

Step A.....	p.33 à 34
Step B.....	p.35
Step C.....	p.36
Step D.....	p.36
Step E.....	p.37
Step F.....	p.38
Step G.....	p.39
Step H.....	p.40
Step I.....	p.41
Step J.....	p.41
Step K.....	p.42
Step L.....	p.43
Step M.....	p.43

5.

Results p.44 to 45

Introduction

Legio EZ-Count * is a simple and fast kit which detects only bacteria *Legionella pneumophila* capable of being cultivated (as well as regulatory procedure NF T90-431) in Cooling Towers Waters samples..

Legio EZ-Count identifies in 48 hours Cooling Towers Waters contain less than 1 000 CFU/L, between 1 000 and 100 000 CFU/L or more that 100 000 CFU/L of *L. pneumophila*.



Technology used

This solution uses a patented innovative technology** which combines:

- (i) culturing on selective agar GVPC of the sample to be analyzed,
- (ii) assimilation only by the *L. pneumophila* of a modified sugar,
- (iii) revelation of this modified sugar present after the assimilation in the part O-antigenic of lipopolysaccharide of *L. pneumophila*, through a reaction based on « click » chemistry for realizing colorimetric and enzymic reaction.

Recommendations for an optimal use

You are required to carefully read the protocol before carrying out the analysis. If in doubt, contact the service support.

- The protocol is safe in normal condition of use. As the water sample may potentially contain *L. pneumophila*, you are required to take the usual precautions throughout the analysis.
- Avoid any contact with skin, eyes and splashing.

- Keep the reagents kits away from children.
- Store the **Legio EZ-Count** reagents kit between +4°C and +8°C (ideally at +4°C) upon reception. A punctual exposition at ambient temperature (especially during transport, ...) is not detrimental.
- Do not expose to temperatures lower than 0°C.
- The **Legio EZ-Count** reagents kit is exclusively intended to be used with the following equipment:
 - Multi-tests Field Equipment
 - Filtration Manifold
- You are required to carefully read the instructions for use of the equipment you choose to use before beginning the analysis.
- The compliance of the protocol, of the indicated times and of the expiry date appearing on the box guarantee the performance of the kit.
- Do not expose the reagents to the sun.
- The analysis must be conducted quickly after taking your water sample.
- The water sample must not be kept cool before performing the analysis.
- At the conclusion of the analysis, remove the waste in accordance with the best practices from your establishment.

***Legio EZ-Test is a registered trademark of the company Diamidex.*

***Identification of living Legionella pneumophila using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling. Mas Pons J, Dumont A, Sautejeau G, Fugier E, Baron A, Dukan S, Vauzeilles B. Angew Chem Int Ed Engl. 2014 Jan 27;53(5):1275-8.*

• **IMPORTANT**

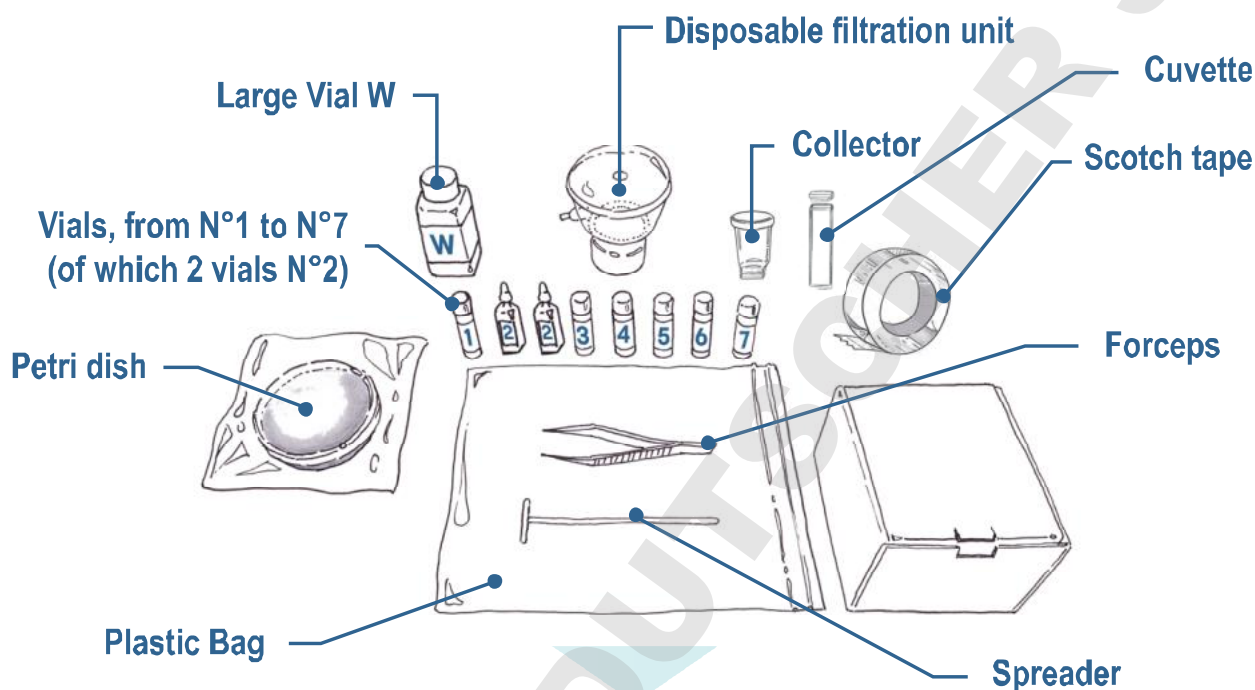


Use this kit only for environmental analyses of Drinking Waters and Hot Domestic Waters.

For technical assistance, please contact the technical support.
Contact information on the back of this leaflet

Contents of the reagents kit Legio EZ-Count

Box containing :



Each **Legio EZ-Count** reagent kit allows to carry out 1 analysis, for 1 Cooling Towar water sample.

To carry out new analyzes, please use new **Legio EZ-Count** reagents kits, each kit containing all the consumables mentioned above.

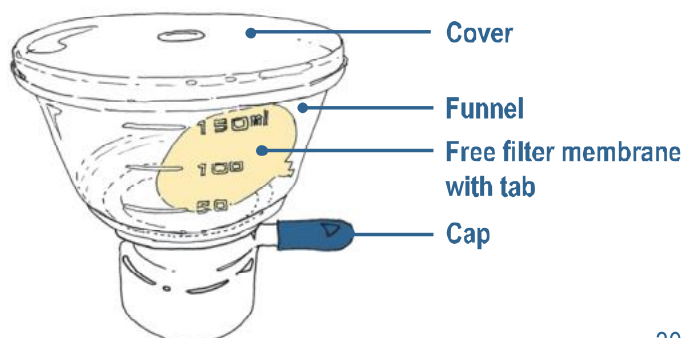
• IMPORTANT

From the receipt, store the Legio EZ-Count reagents kits in the refrigerator (+4°C and +8°C). The disposable filtration unit can be stored separately in a clean area, away from heat and moisture.

Disposable filtration unit

The Disposable Filtration Unit is a non-reusable consumable, used for the 2nd part of the protocol.

This consumable is supplied with each **Legio EZ-Count** reagents kit.



Preparations before analysis

IMPORTANT

The analysis should be carried out on a horizontal and dry surface.

The analysis protocol consists of 3 parts:

PART 1 : PREPARATION OF THE SAMPLE.

Step A to Step E : About 10 minutes of handling.

Incubation :

Step F : This part will require 47 hours of incubation. Be sure to take all the precautions indicated in the instructions for the equipment used, so that no interruption of the incubation cycle occurs, otherwise the results of the analysis can be compromised. Make sure you can **continue the analysis at the end of the 47 hours of incubation.**

PART 2 : REVELATION AND READING OF THE RESULT.

Step G to Step M : This part will require 50 minutes of handling.

• IMPORTANT

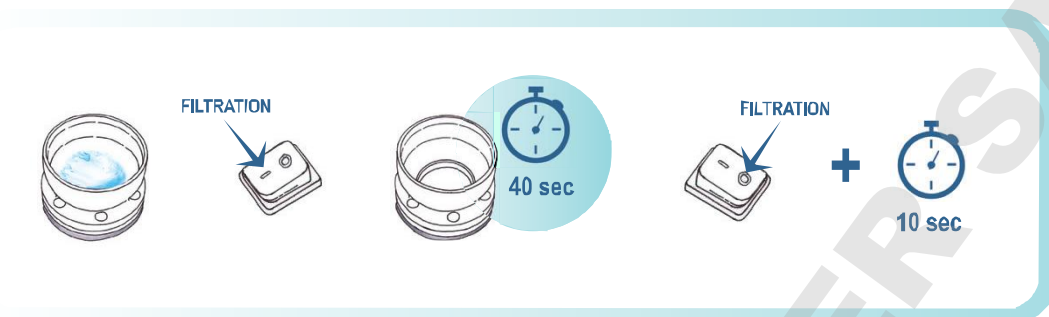
Please plan these steps carefully, taking into account their duration, in order to guarantee the results of the analysis.

[FILTER]

or



NB : In the rest of this protocol, the [FILTER] symbol will be associated with the following manipulations:



- Turn on the pump
- Wait until the liquid is completely sucked
- **Important** : Even if the liquid seems to have been completely drawn in, the pump must remain running for at least 40 seconds.
- Turn off the pump
- Once the pump is off, wait 10 more seconds before proceeding to the next step.

Indeed, you must be certain that the aspiration is complete before pouring another reagent. If the aspiration has not been completed, the next reagent may be aspirated before it can take effect.

The ways of turning on / off the pump are specific to the equipment chosen for the analyzes. Please refer to the corresponding instructions for use.



WARNING

In the case of a sample of water heavily loaded with impurities, we recommend prefiltering your sample with a 10µm filter.

If a filtration problem is encountered, refer to the «malfunctions» chapter of the chosen equipment instructions for use.

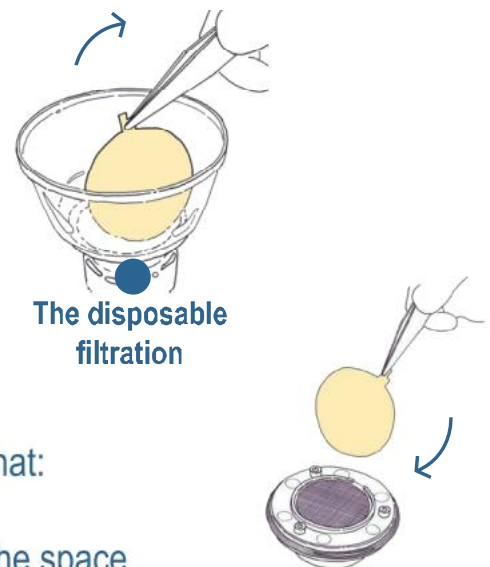
Step by step procedure

STEP A

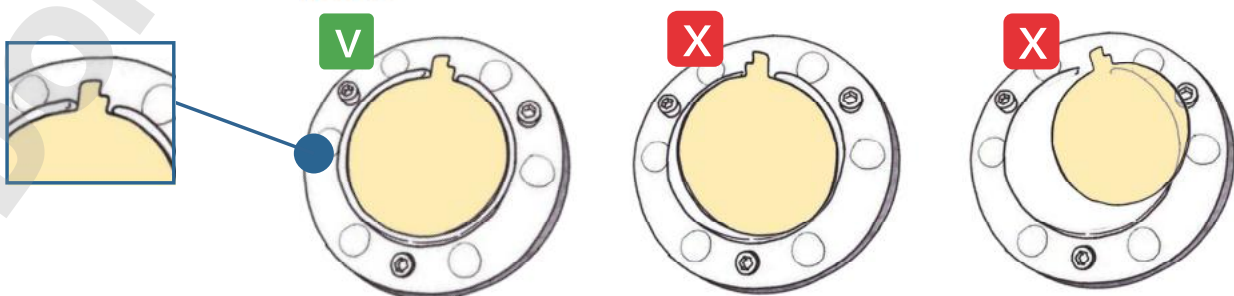
- Take the membrane support and the magnetized funnel provided with the equipment chosen to perform the analysis.
- Position the membrane support on the equipment.
- Remove the **Legio EZ-Count** reagents kit from the refrigerator.
- Remove the disposable filtration unit from its bag while holding in place its cover.

NB : This part will not require the use of the disposable filtration unit, only the membrane located inside. The disposable filter unit will be retained for Part 2 of the protocol.

- Using the forceps, grab the free membrane of the disposable filtration unit by its lateral tab.
- ➔ **Do not grab it in any other place as the forceps could damage the membrane and compromise the results of the analysis.**



- Position the membrane on the membrane support so that:
 - It forms an « L » as shown on the diagram below.
 - It is perfectly centered on the membrane support, in the space provided for this purpose.

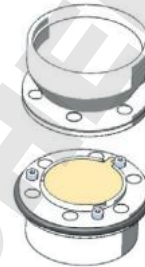


• IMPORTANT



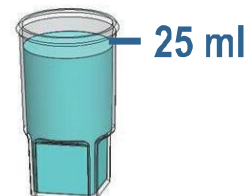
The membrane must be centered and placed permanently on the same face throughout the analysis, otherwise the results of the analysis will be compromised.

- Position the magnetized funnel on the membrane support. Make sure that the magnets of the funnel and the membrane support engage properly.



- Put the cover back on the disposable filtration unit and store it in its bag.

- Pour the water sample into the collector until it is full (the volume is 25 ml, the water sample must be at room temperature).

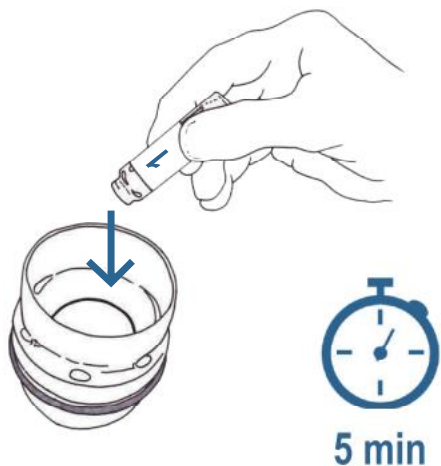


- If you perform multiple analyzes simultaneously, be sure to use a different collector for each one of your samples, so they won't contaminate each-other and compromise the results of the analyzes.
- Then replace the collector in the **Legio EZ-Count** reagents kit, it will be used again at the end of the analysis protocol.

[FILTER]



STEP B

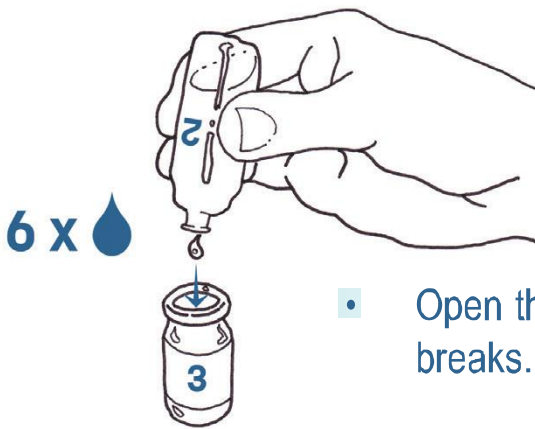


- Once the filtration is complete and the vacuum pump is stopped, open vial N°1 and slowly pour all of its contents into the funnel.
- Close surely and throw away vial N°1 in the plastic bag.
- Start the timer for 5 minutes.

During these 5 minutes, carry out step C.



STEP C



- Open the vial N°2 (pod) by tilting its cap on the side until it breaks.
- Open the vial N°3.
- By pressing on the vial N°2, pour 6 drops into the vial N°3.
- Close surely vial N°3.

➔ Keep vials N°2 and N°3 nearby. ←

- After the 5 minutes :

[FILTER]

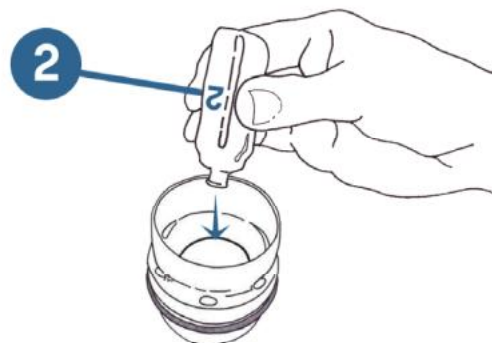


STEP D

- Slowly pour the whole vial N°2 into the center of the funnel.

- Throw away vial N°2.

[FILTER]



STEP E

a/



- Remove the Petri dish from its pouch. A notch on the edge of the bag allows easy opening.
- Remove its cover from the Petri dish.

b/



- Do not touch the inside of the Petri dish to avoid contaminating it.
- Pour the whole vial N°3 into the center of the Petri dish.
- Do not spread the liquid.

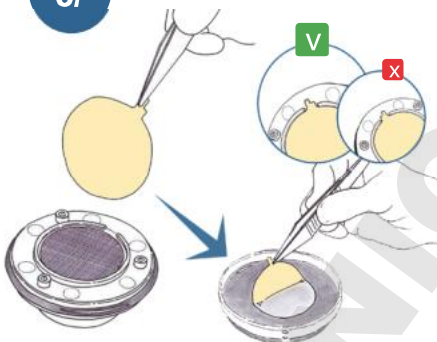
• IMPORTANT



Do not move the Petri dish, the deposited liquid must remain in the center.

- Remove the magnetized funnel from the membrane support.

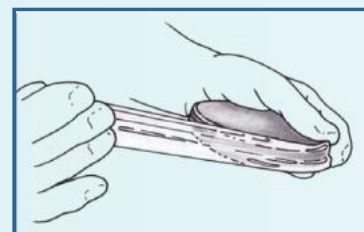
c/



- Using the forceps, grab by its lateral tab the free membrane located onto the membrane support.
- Carefully place it as shown in the diagrams opposite.
- Place the edge of the membrane at the edge of the drop previously deposited at the center of the Petri dish, so that the liquid is in contact with the entire surface of the membrane.
- Make sure there is no bubble underneath the membrane.
- With the tab still forming an « L ».

d/

- Replace the cover of the Petri dish. Keep the box perfectly horizontal.
- Apply the adhesive tape all around the box making 2 turns.
- Keep the forceps for further analysis.
- Turn the Petri dish upside down so that its cover is underneath (black face up).



STEP F

INCUBATE THE PETRI DISH ACCORDING TO THE EQUIPMENT USED:

EQUIPEMENT	INCUBATION
Multi-tests Field Equipment	Cooling Tower Mode
Laboratory Incubator	45 minutes at 52°C then 47 hours at 37°C

Put back the **Legio EZ-Count** reagents kit in the refrigerator.

CLEAN THE MEMBRANE SUPPORT AND THE MAGNETIZED FUNNEL AS DESCRIBED IN THE INSTRUCTIONS SUPPLIED WITH YOUR EQUIPMENT.

• **IMPORTANT**

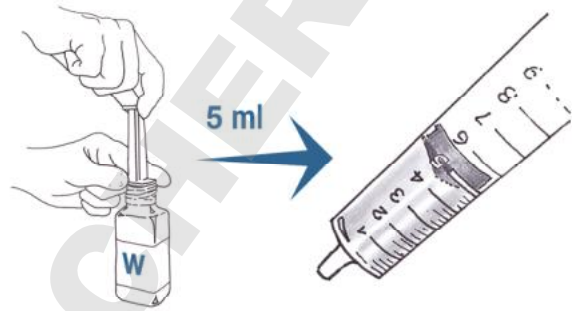
Note the day and time of the beginning of the incubation and come back after 47 hours to carry out the 2nd part of the analysis.



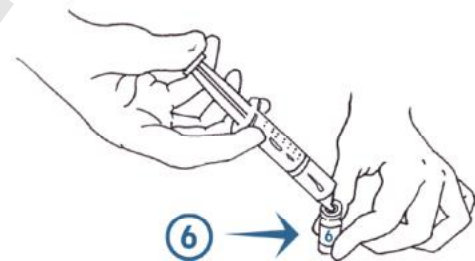
47H

STEP G

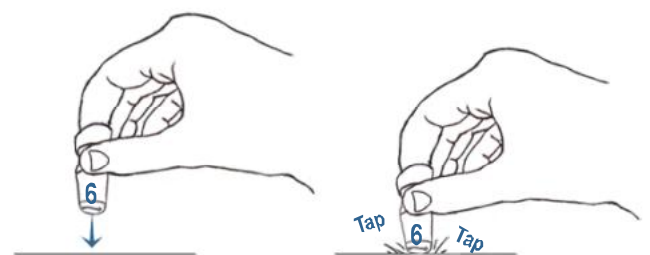
- After 47 hours, remove the **Legio EZ-Count** reagents kit from the refrigerator.
- Open the vial N°6.
- Take precisely 5ml of the vial W by using the syringe provided with the equipments (avoid the presence of air in the syringe)



- **Carefully transfer these 5 ml into the vial N°6.**
- Close surely the vial N°6.

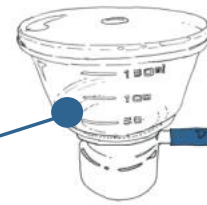


- Tap the bottle on the worktop, so that the liquid passes well under the powder.
- Reposition vial N°6 at its numbered location in the consumable box and let stand until Step K.

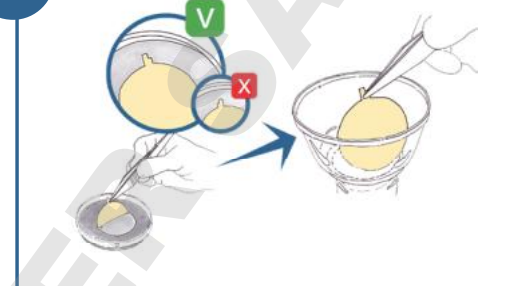


STEP H

- **TAKE THE DISPOSABLE FILTRATION UNIT.**
- Remove the Petri dish from the incubator.
- Place the disposable filtration unit on the equipment you are using to conduct the analysis.
- Remove its cover from the disposable filtration unit.
- Remove the adhesive tape and the cover from the Petri dish.
- Using the forceps, grab the free membrane by its lateral tab and place it into the center of the funnel.



a/



• IMPORTANT



At this point, and in most cases, the membrane will have few (or no) elements visible to the eye. If you notice many spots on the membrane, this may indicate that your water sample was heavily loaded with microorganisms and prevent the next filtration from working. If the following filtration does not work, please refer to the examples at the end of this leaflet.

• FOR REMINDER

Respect the diagram below: **the tongue forming an «L»**. The membrane must be perfectly **centered at the bottom of the funnel**.

- Throw away the Petri dish and the forceps in the plastic bag.
- Take **10 ml from the vial W** with the syringe.
- Empty the contents of the syringe into the center of the funnel.
- Gently rub the entire surface of the membrane with the spreader **for 30 seconds**.
- Throw away spreader in the plastic bag.

b/



c/



- Take a second time 10 ml from the vial W with the syringe.

- Empty the contents of the syringe into the center of the filtration unit.


[FILTER]



STEP I

a/



- The pump being turned off, make sure the pressure gauge needle is at «0» (if your equipment has a pressure gauge).
- Open the vial N°4 and pour all its content into the center of the funnel.
- Respect a waiting time of 5 minutes.
- After the 5 minutes : **[FILTER]** 

b/



- Take 10 ml from the vial W with the syringe.
- Empty the contents of the syringe into the center of the funnel.

[FILTER] 

STEP J

a/

- With the pump still off, open the N°5 vial and pour all its content into the center of the funnel.
- Start the timer for 1 minute.
- Close surely vial N°5 and throw it away in the plastic bag.

After 1 minute :

[FILTER] 



b/

- Take 10 ml from the vial W with the syringe.
- Empty the contents of the syringe into the center of funnel.

[FILTER] 



STEP K

a/

- Take vial N°6 and shake until completely dissolved (the solution should be homogeneous).

➔ To do this, keep the cap in place, and shake it gently upside down several times in a row.

- With the pump still off, pour the contents from vial N°6 into the center of the funnel.
- Close surely the filtration unit with its cover.
- Respect a waiting time of 30 minutes.
After these 30 minutes :

[FILTER] 



30 min

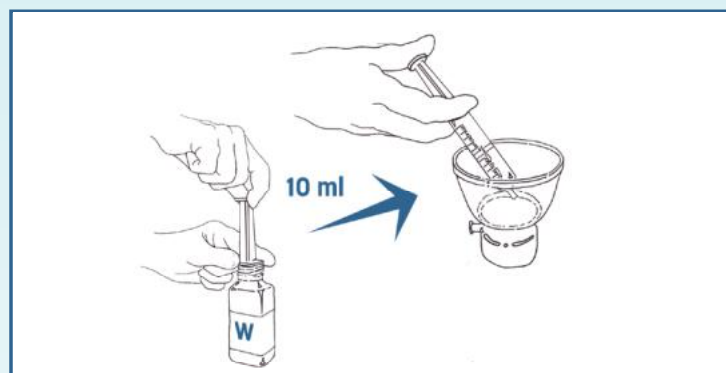
b/

- Take 10 ml from the vial W with the syringe.
- Empty carefully the contents of the syringe into the center of funnel.

[FILTER] 

- Take a second time 10 ml from the vial W with the syringe.
- Empty the contents of the syringe into the center of funnel.

[FILTER] 

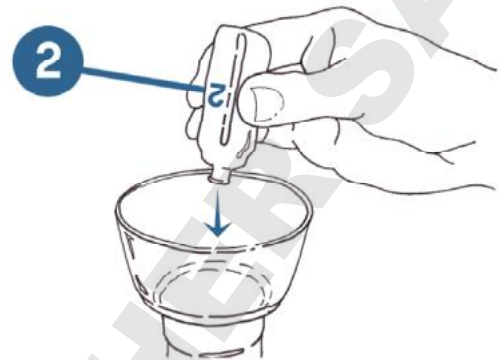


(bis)

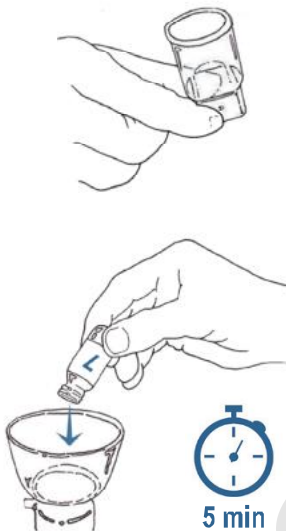
STEP L


- Pour the contents of the remaining vial N°2 (pod) into the center of the funnel.

[FILTER] 



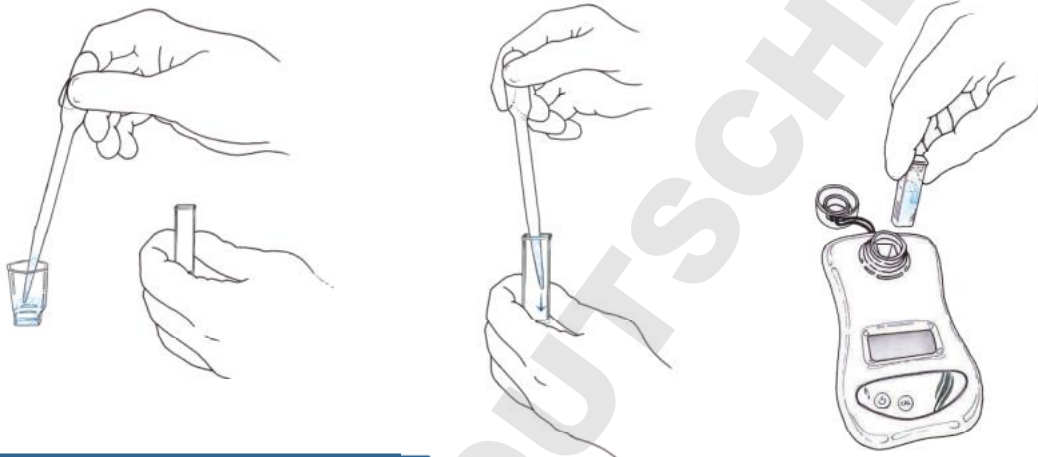
STEP M



- Place the collector under the disposable filtration unit according to the type of equipment you are using for conducting the analysis.
- With the pump still off, pour the contents of the vial N°7 into the center of the funnel.
- Replace its cover on the disposable filtration unit.
- Respect a waiting time of 5 minutes.
- Close surely vial N°7 and throw it away into the plastic bag.
- After these 5 minutes:
[FILTER] 
- Respect a waiting time of 5 minutes again.

RESULTS

- Once the 5 minutes have passed, get the collector back using the forceps and transfer a portion of the liquid of the collector into the cuvette using the pipette provided. The cuvette must be filled by more than half to allow reading.
- Place the cuvette in the colorimeter, and read the absorbance.



• IMPORTANT

The cuvette must be set in a certain direction so that the absorbance reading can be performed correctly. Please refer to the operating instructions of the colorimeter supplied with your equipment.

- If the number displayed on the colorimeter is **less than 0.24** then the result is **NEGATIVE** (the water sample tested contains less than 1000 CFU/L of *Legionella pneumophila*).
- If the number displayed is **between 0.24 and 0.6** then the water sample tested contains **between 1 000 CFU/L and 100 000 CFU/L** of *Legionella pneumophila*.
- If the number displayed is **greater than 0.6** then the water sample tested contains **at least 100 000 CFU/L** of *Legionella pneumophila*.

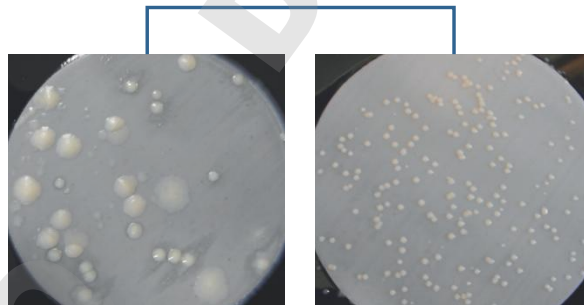
END OF ANALYSIS, MAINTENANCE OF EQUIPMENT

- Once the analysis is complete, dispose of the waste (plastic bag containing the empty bottles, disposable filtration unit ... and liquid waste) according to the best practices of your institution.
- Clean the equipment in accordance with the maintenance recommendations detailed in the instructions for use supplied with any one of them.
- The syringe must be rinsed with clean water and dried before being stored in your equipment.

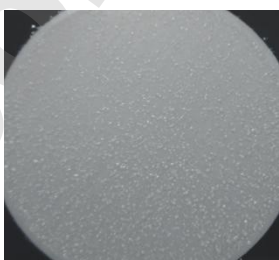
• IMPORTANT

No liquid should remain inside the equipment, which must be clean and dry before being transported and/or stored.

The filtration step after incubation did not work, the membrane presents a large number of spots. Case examples:



Presence of an interfering flora too important to interpret the concentration of *Legionella pneumophila* in your sample. In this type of case, most methods of detection and enumeration of *Legionella pneumophila* will give uninterpretable results.



WARNING

Your sample most likely contains a very large amount of *Legionella pneumophila* (> 100 000 CFU/L).

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Ref : 00-388-A

Protocole d'Analyse Legio EZ-Count | Analysis Protocol Legio EZ-Count

© Diamidex 2019

