

RIDASCREEN[®] Legionella

N.º de artículo: C8001



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania.

Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Diagnóstico *in vitro*. RIDASCREEN® Legionella es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa de antígenos de *Legionella pneumophila* en muestras de orina.

2. Resumen y descripción del ensayo

El género *Legionella* pertenece a la familia *Legionellaceae* y cuenta con 40 especies y más de 70 serogrupos. *Legionella* es una bacteria gramnegativa, intracelular facultativa, cuya máxima tasa de infecciones se produce durante el verano y principios del otoño. En el caso de la enfermedad del legionario, se ha hecho una distinción entre infecciones adquiridas externamente debido a viajes e infecciones nosocomiales. La tasa de mortalidad por infecciones nosocomiales en Estados Unidos se sitúa entre el 15 % y el 20 %^{1,2}. En Europa, la enfermedad del legionario es mortal en el 12 % de los casos. De entre el elevado número de especies de *Legionella*, hay dos que son patógenos humanos importantes. La infección por *L. pneumophila* provoca principalmente a la enfermedad del legionario (conocida también como legionelosis) mientras que *L. longbeachae* causa la fiebre de Pontiac. La fiebre de Pontiac es una enfermedad aguda autolimitada, similar a la gripe, sin neumonía. Aproximadamente el 7 % de los pacientes con enfermedad del legionario desarrollan fiebre de Pontiac³.

Existen 16 serogrupos de *L. pneumophila*; más del 70 % de las infecciones por *Legionella* en Europa están causadas por *L. pneumophila* del serogrupo 1. Otras especies de *Legionella* que pueden causar infecciones son *L. micdadei*, *L. L. bozemanii*, *L. dumoffii* y *L. longbeachae*⁴.

La enfermedad del legionario es una infección respiratoria aguda causada fundamentalmente por *L. pneumophila*. Se describió por primera vez en 1976, cuando apareció un brote durante una convención en Filadelfia (EE.UU.), donde tomó el nombre de «enfermedad del legionario». Se produjeron otros dos brotes de la enfermedad del legionario, con un total de 6 muertes, en 2013 en Brisbane (Australia) y Reynoldsburg, Ohio (EE.UU.). Los síntomas son fiebre, tos (seca o expectorante) y escalofríos. Otros síntomas menos frecuentes son diarrea, vómitos, bradicardia e hiponatremia³. Personas de cualquier edad pueden verse afectadas por la enfermedad del legionario, pero son más sensibles a este tipo de infección los ancianos, los fumadores y los pacientes con trastornos pulmonares crónicos. En los países con un sistema sanitario eficaz, hasta el 90 % de los casos de enfermedad del legionario no se diagnostican, ya que los síntomas clínicos son muy difusos y la enfermedad solo llega a producirse en casos bastante raros. Además, es muy difícil diferenciar la enfermedad del legionario de otras formas de neumonía solo basándose en los síntomas o las exploraciones radiológicas.

La posibilidad de detectar de forma muy precoz antígenos solubles específicos de *Legionella* en la orina de pacientes con la enfermedad del legionario hacen de la orina una matriz de exploración idónea para los estadios tanto iniciales como tardíos de la legionelosis^{5,6}. RIDASCREEN® Legionella ELISA es especialmente adecuado para la detección de antígenos solubles de *Legionella* en la orina de pacientes infectados con *Legionella pneumophila* del serogrupo 1.

3. Principio de la prueba

El ensayo RIDASCREEN® Legionella utiliza anticuerpos específicos con un método tipo sandwich. La superficie de la placa de microtitulación está recubierta de anticuerpos policlonales contra los antígenos LPS de Legionella. Las muestras de orina para análisis y las muestras control se pipetea en los pocillos de la placa de microtitulación junto con anticuerpos policlonales biotilados anti-Legionella (conjugado 1) y se incuba todo a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasas y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba nuevamente a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Si una muestra de orina contiene antígenos de Legionella, se forma un complejo tipo sandwich compuesto de anticuerpos inmovilizados, los antígenos de Legionella y los anticuerpos conjugados con el complejo de biotina, estreptavidina y peroxidasa. En otro paso de lavado se elimina el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina no unido. En las muestras positivas, la adición de un sustrato provoca que la coloración de la solución con el enzima unido vire de incolora a azul en los pocillos de la placa de microtitulación. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de antígenos de Legionella presentes en la muestra de orina.

4. Contenido del envase

Los reactivos del kit son suficientes para 96 ensayos.

Plate	96	Placa de microtitulación, 12 tiras de microtitulación (divisibles) en un portatiras; recubiertos con anticuerpos policlonales contra <i>L. pneumophila</i>
Wash	100 ml	Búfer de lavado, solución de NaCl tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal al 0,1 %
Control +	2 ml	Control positivo, antígenos de Legionella inactivados; listo para usar
Control -	2 ml	Control negativo; listo para usar
Conjugate 1	13 ml	Anticuerpos policlonales contra <i>L. pneumophila</i> conjugados con biotina en solución proteica estabilizada; listo para usar; color amarillo
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución proteica estabilizada; listo para usar; color naranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N; listo para usar

5. Instrucciones de almacenamiento de los reactivos

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 – 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si el búfer de lavado se almacena a 2 - 8 °C, puede utilizarse como máximo durante 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. No se garantiza la calidad una vez alcanzada la fecha de caducidad de los reactivos.

Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se separe el precinto de seguridad. Retornar las tiras de microtitulación que no se necesiten a la bolsa de aluminio y almacenarlas inmediatamente a 2 - 8 °C.

El substrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el substrato si ha virado a color azul.

6. Reactivos necesarios pero no suministrados

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Viales de muestras
- Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
- Micropipetas de 50 - 100 µL
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Dispositivo de lavado de placas de microtitulación o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro para placas de microtitulación (450 nm y filtro de referencia de 620 - 650 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito al 0,5 %

7. Medidas de precaución

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.

No pipetear las muestras ni los reactivos con la boca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata, gafas de protección) al manipular las muestras y lavarse las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras.

Para más información, consultar la hoja de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

El control positivo del kit contiene antígenos de Legionella inactivados que, al igual que las muestras de los pacientes, deben manipularse como materiales potencialmente infecciosos, de acuerdo con la normativa nacional de seguridad.

Los reactivos y el material usados deben desecharse de forma correcta y responsable. Se debe cumplir la normativa nacional aplicable a la hora de desecharlos.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras de orina deben recogerse en frascos transparentes estándar y pueden almacenarse hasta 24 horas a temperatura ambiente o a 2 - 8 °C, antes del uso. Además, a 2 - 8 °C es posible un almacenamiento hasta 3 días. Si es necesario un almacenamiento más prolongado, deben mantenerse a -20 °C.

No congelar y descongelar la muestra repetidamente. No guardar las muestras de orina en recipientes de transporte que contengan medios con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el ensayo RIDASCREEN® Legionella ELISA.

9. Ejecución de la prueba

9.1. General

Todos los reactivos y la placa de microtitulación **Plate** deben llevarse a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de utilizarlos. No sacar las tiras de microtitulación de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado la temperatura ambiente. Los reactivos deben mezclarse bien inmediatamente antes de usarlos. Tras su uso, las tiras de microtitulación (colocadas en bolsas selladas) y los reactivos deben almacenarse de nuevo a 2 - 8 °C. Una vez usadas, las tiras de microtitulación no podrán utilizarse de nuevo. No utilizar los reactivos y las tiras de microtitulación si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit.

No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de microtitulación o sellarla con un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación de las muestras

Toda la orina debe mezclarse cuidadosamente y después puede usarse sin diluir para realizar el ensayo.

Los cristales que pudieran haberse formado durante el almacenamiento de la muestra de orina deben disolverse completamente calentándola a 37 °C antes de proceder al ensayo.

Si la orina contiene partículas por cualquier motivo, debe filtrarse antes del uso.

9.3. Primera incubación

Tras insertar el número necesario de pocillos en el portatiras, añadir 100 µl del control positivo **Control +**, el control negativo **Control -** o la muestra de orina. A continuación, añadir 100 µl

del anticuerpo conjugado con biotina **Conjugate | 1** y mezclar (golpeando suavemente contra un lado de la placa); incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 60 minutos.

9.4. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si se quieren obtener resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con la normativa oficial. Acto seguido, sacudir la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de búfer de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar que esté ajustado correctamente; solicitar las configuraciones al fabricante, si es preciso. Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con configuraciones y protocolos de trabajo validados. Solo deben utilizarse muestras de orina libres de partículas, de acuerdo con las instrucciones de preparación de la muestra (ver 9.2.) para evitar que se bloqueen las boquillas de lavado. Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.

9.5. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina **Conjugate | 2** en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 30 min.

9.6. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.4.

9.7. Tercera incubación

Llenar todos los pocillos con 100 µl de sustrato **Substrate**. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada **Stop** para detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcional: 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de microtitulación.

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se realice el ensayo, a fin de garantizar que los reactivos sean estables y que el ensayo se realice correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (DO)

de control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del substrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado.

Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Ejecución de la prueba correcta
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas; no utilizar soluciones de substrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del corte

Con objeto de establecer el corte, se añaden 0,15 unidades de extinción a la extinción medida para el control negativo.

$$\text{Corte} = \text{tasa de extinción del control negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es positiva si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es marginal y deberá repetirse el ensayo si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10% mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba con una muestra de orina fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la muestra debe considerarse negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse negativas.

12. Limitaciones del método

El ensayo RIDASCREEN® Legionella detecta los antígenos solubles de la bacteria Legionella en muestras de orina. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro y los síntomas clínicos.

Un resultado positivo no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos.

Un resultado negativo no permite descartar la posibilidad de una infección por Legionella. Este resultado puede deberse a la excreción intermitente del patógeno en la orina o a que la cantidad de antígeno en la muestra sea demasiado pequeña. Si la historia del paciente da pie a sospechar una infección con *Legionella pneumophila*, deberá repetirse la prueba con una muestra de orina diferente.

Un resultado marginal puede deberse a la distribución no homogénea de los antígenos en la muestra de orina. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda muestra o solicitarse una nueva muestra de orina del paciente.

13. Características de rendimiento

13.1. Calidad del ensayo

En un estudio retrospectivo de validación con RIDASCREEN® Legionella ELISA se analizaron 100 muestras de orina. Estas muestras se tomaron para los análisis diagnósticos rutinarios en el Legionella Reference Laboratory de Dresden (Alemania) donde se mantuvieron a -20 °C. Tras su descongelación, las muestras se sometieron a análisis comparativos con RIDASCREEN® Legionella ELISA y otra prueba ELISA comercialmente disponible. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Correlación entre RIDASCREEN® Legionella ELISA y otra prueba ELISA comercialmente disponible

		ELISA	
		Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Legionella	Positivo	59	2
	Negativo	4	30

Coincidencia de positivos: 95,2 %

Coincidencia de negativos: 90,9 %

13.2. Reactividad cruzada

Se investigaron varios microorganismos patógenos con RIDASCREEN® Legionella ELISA y se demostró la ausencia de reactividad cruzada excepto para *S. aureus*. Estos estudios se realizaron con suspensiones de bacterias que presentaban concentraciones de 10⁶ a 10⁹ microorganismos por ml. Los sobrenadantes de los cultivos víricos y los antígenos se resumen en la lista correspondiente. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos

Microorganismo	Origen	Valor medio [DO 450/620]
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,005
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivo	0,118
<i>Campylobacter coli</i>	Cultivo	0,131
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultivo	0,068
<i>Candida albicans</i>	Cultivo	0,043
<i>Candida glabrata</i>	Cultivo	0,023
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo	0,047
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Cultivo	0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo	0,046
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	0,097
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	0,057
<i>Haemophilus influenzae</i>	Cultivo	0,019
Gripe A/Beijing	Antígeno para ELISA	0,011
Gripe A/Sydney	Antígeno para ELISA	0,010
Gripe B/Harbin	Antígeno para ELISA	0,020
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultivo	0,035
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Antígeno para ELISA	0,022
Virus paragripal	Antígeno para ELISA	0,093
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultivo	0,020
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	0,038
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	0,023
Virus respiratorio sincicial	Antígeno para ELISA	0,050
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultivo	0,066
<i>Serratia marcescens</i>	Cultivo	0,007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo	3,579
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	0,041
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cultivo	0,020
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cultivo	0,049
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cultivo	0,045

13.3. Precisión

La reproducibilidad de RIDASCREEN® Legionella ELISA se analizó con seis referencias representativas del rango de medida completo, desde negativo a positivo alto. Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para tres lotes. Para la reproducibilidad interensayo se analizaron referencias en forma de duplicados de 10 días de trabajo diferentes, con 2 ensayos por día. Las medidas fueron realizadas sobre 3 lotes por 6 técnicos. La

reproducibilidad interlote se determinó para los 3 lotes. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Resultados de reproducibilidad/precisión de RIDASCREEN® Legionella ELISA

Referencia Valor medio /CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lotes kit 1-3
1	MV	3,015	3,248	2,900	2,780	2,499	2,573	2,617
	CV (%)	2,94%	4,71%	3,88%	11,54%	12,15%	7,19%	11,73%
2	MV	2,702	2,868	2,674	2,515	2,180	2,305	2,333
	CV (%)	4,78%	8,70%	4,55%	12,63%	15,27%	8,54%	14,12%
3	MV	1,559	1,460	1,412	1,354	1,094	1,210	1,219
	CV (%)	5,99%	9,65%	5,42%	17,73%	15,94%	10,38%	18,34%
4	MV	0,838	0,701	0,725	0,672	0,513	0,587	0,591
	CV (%)	4,75%	9,72%	6,08%	19,99%	17,46%	11,67%	21,51%
5	MV	0,759	0,618	0,726	0,593	0,449	0,504	0,515
	CV (%)	11,11%	9,09%	7,41%	22,56%	21,44%	13,76%	24,10%
6	MV	0,003	0,000	0,007	0,008	0,001	0,008	0,006
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

13.4. Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica de RIDASCREEN® Legionella ELISA, se analizó el límite del blanco (limit of blank, LoB) en 270 ensayos de muestras de orina negativas y el límite de detección (limit of detection, LoD) en 90 ensayos. Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Resultados de la sensibilidad analítica del RIDASCREEN® Legionella ELISA

	MV [DO 450/620]	ng/ml
LoB	0,041	–
LoD	0,060	1,5

13.5. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con muestras de orina positivas y negativas para Legionella en las concentraciones descritas:

Sangre humana (10 % v/v), amoxicilina (antibiótico; 0,72 % p/v), paracetamol (analgésico; 1,08 % p/v), jarabe para la tos con codeína (0,25 % v/v), albúmina (0,5 % p/v), glucosa (2 % p/v), ácido ascórbico (vitamina C; 0,1 % p/v), bilirrubina (0,02 % p/v), ácido bórico (0,26 % p/v), eritromicina (antibiótico; 0,06 % v/v). Levofloxacino mostró una reducción proporcional a la dosis en los valores de DO si se mezclaba con la orina a concentraciones de 2x a 3x la dosis diaria.

Anexo

Símbolos específicos de prueba:

Plate	Placa de micropocillos
Wash	Búfer de lavado
Control +	Control positivo
Control -	Control negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Substrato
Stop	Reactivo de parada

Bibliografia

1. Howden BP et al. Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484–488.
2. Benin AL et al. An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237–243.
3. Bartram et al. *Legionella and the prevention of Legionellosis*. 2012, World Health Organisation (WHO).
4. Joseph C et al. Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311–320.
5. Berdal BP et al. Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *J.Clin.Microbiol*. 1979 (9): 575-578
6. Kohler RB et al. onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. *J.Clin.Microbiol*. 1984 (20) 605-607