

RIDASCREEN[®] Legionella

Nº do art.: C8001



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

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



1. Uso previsto

Para uso em diagnóstico *in vitro*. RIDASCREEN® Legionella é um ensaio imunoenzimático para a detecção qualitativa de antígenos de *Legionella pneumophila* em amostras de urina.

2. Sumário e explicação do teste

A variedade *Legionella* pertence à família *Legionellaceae* e é dividida em 40 espécies, com mais de 70 sorogrupos. As bactérias *Legionella* são bactérias gram-negativas intracelulares facultativas, cujo pico de taxa de infecção ocorre no verão e no começo do outono. Na legionelose, a diferenciação é feita entre infecções adquiridas externamente devido a infecções nosocomiais e de viagem. Nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade de infecções nosocomiais está entre 15 e 20%.^{1,2} Na Europa, 12% de todos os casos de legionelose são fatais. O grande número de espécies de *Legionella* inclui duas espécies que são patógenos humanos importantes. A infecção com *L. pneumophila* resulta principalmente em legionelose (também conhecida como doença do legionário), e a *L. longbeachae* causa a febre de Pontiac. A febre de Pontiac é uma doença autolimitante aguda que assemelha-se à gripe, porém sem a ocorrência de pneumonia. Aproximadamente 7% dos pacientes que sofrem de legionelose desenvolvem febre de Pontiac.³

A *L. pneumophila* possui 16 sorogrupos; mais de 70% das infecções por *Legionella* na Europa são causadas pelo sorogrupo *L. pneumophila* 1. Outras variedades que podem causar a infecção por *Legionella* incluem *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* e *L. longbeachae*.⁴

A legionelose é uma infecção respiratória aguda, que é causada, principalmente, pela *L. pneumophila*. Ela foi descrita pela primeira vez em 1976, durante um congresso na Filadélfia, EUA, onde a doença do legionário recebeu seu nome. Dois outros surtos de legionelose, com um total de 6 fatalidades, ocorreu em 2013, em Brisbane, Austrália e Reynoldsburg, Ohio. Os sintomas são febre, tosse (com ou sem produção de expectoração) e tremores. Outros sintomas menos frequentes são diarreia, vômitos, bradicardia e hiponatremia.³ Indivíduos de todas as idades podem ser infectados pela legionelose, mas idosos e fumantes, além de pacientes com problemas crônicos de pulmão são mais suscetíveis a essa infecção. Mesmo em países com um sistema de saúde eficaz, até 90% dos casos de legionelose não são diagnosticados, pois os sintomas clínicos são muito difusos e a doença ocorre com uma frequência bastante rara. Além disso, é difícil diferenciar a legionelose de outras formas de pneumonia apenas com base nos sintomas ou em exames radiológicos.

A detectabilidade bastante antecipada de antígenos solúveis específicos da *Legionella* na urina de pacientes com legionelose torna a urina uma matriz de exame ideal para os estágios iniciais e posteriores de legionelose^{5,6}. O RIDASCREEN® Legionella ELISA é adequado especialmente para a detecção de antígenos de *Legionella* solúveis na urina de pacientes infectados com *Legionella pneumophila* do sorogrupo 1.

3. Princípio do teste

O teste RIDASCREEN® Legionella utiliza anticorpos específicos em um método do tipo sanduíche. A superfície da placa de microtitulação é revestida com anticorpos policlonais contra os antígenos do Legionella LPS. Uma pipeta é usada para colocar as amostras de urina usadas para o exame, assim como as amostras de controle, no poço da placa de microtitulação, juntamente com anticorpos antilegionella policlonais biotinizados (Conjugado 1) para incubação em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) Após um estágio de lavagem, o conjugado de estreptavidina poliperoxidase (Conjugado 2) é adicionado e incubado novamente em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). Se os antígenos de Legionella estiverem presentes na amostra de urina, um complexo de sanduíche se formará, que consiste em anticorpos imobilizados, antígenos de Legionella e os anticorpos conjugados com o complexo biotina-estreptavidina-peroxidase. Um estágio de lavagem adicional remove o conjugado de estreptavidina poliperoxidase não ligado. Em amostras positivas, a adição de um substrato muda pela enzima ligada, de uma solução incolor nos poços da placa de microtitulação para uma solução azul. A adição de um reagente de parada muda a cor, de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração de antígenos de Legionella na amostra de urina.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 96 exames.

Plate	96	Placa de microtitulação, 12 tiras de microtitulação (que podem ser divididas) em um suporte para tiras; revestidas com anticorpos policlonais contra a <i>L.pneumophila</i>
Wash	100 mL	Tampão de lavagem, solução tampão fosfato de NaCl (concentração 10x); contém 0,1% de timerosal
Control +	2 mL	Controle positivo, antígenos Legionella inativos, prontos para uso
Control -	2 mL	Controle negativo pronto para uso
Conjugate 1	13 mL	Anticorpos de <i>L.pneumophila</i> policlonais conjugados com biotina em solução de proteína estabilizada; prontos para uso; coloração amarela
Conjugate 2	13 mL	Conjugado de estreptavidina poli-peroxidase em solução de proteína estabilizada pronto para uso; coloração laranja
Substrate	13 mL	Peróxido de hidrogênio/TMB; pronto para uso
Stop	12 mL	Reagente de parada; ácido sulfúrico 1N; pronto para uso

5. Instruções de armazenamento para reagentes

Todos os reagentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C e podem ser usados até a data impressa no rótulo. Se o tampão de lavagem diluído for armazenado entre 2 e 8 °C, ele pode ser usado por, no máximo, 4 semanas. A contaminação microbiana deve ser evitada. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade dos reagentes.

A embalagem de alumínio deve ser aberta com tesoura, de modo que o fecho de encaixe não seja separado. As tiras de microtitulação que não forem necessárias devem ser devolvidas à embalagem de alumínio e armazenadas imediatamente à temperatura entre 2 e 8 °C.

O substrato incolor deve também ser protegido da luz direta, para evitar que se decomponha ou fique azul devido à auto-oxidação. Se o substrato ficar azul, ele não deve ser utilizado.

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

6.1. Reagentes

- Água destilada ou desionizada

6.2. Acessórios

- Frascos de amostra
- Misturados vórtice (opcional, veja 9.3)
- Micropipeta para 50 - 100 µL
- Cilindro de medição (1000 mL)
- Cronômetro
- Dispositivo de lavagem para placas de microtitulação ou pipetas multicanal (300 µL)
- Fotômetro para placas de microtitulação (450 nm e filtro de referência de 620–650 nm)
- Papel filtro (toalhas de laboratório)
- Recipiente de descarte com solução de hipoclorito a 0,5%

7. Medidas preventivas

Apenas para diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. Sempre cumpra estritamente as instruções de usuário para esse teste.

Não despeje espécimes ou reagentes pela boca, e evite o contato com membranas mucosas ou pele lesionada. Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os espécimes e lave as mãos após concluir o teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo processadas.

Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

O controle positivo no kit contém antígenos de Legionella inativos, que, assim como as amostras de paciente, devem ser tratados como potencialmente infecciosos, de acordo com as normas nacionais de segurança.

Certifique-se de descartar de modo adequado e responsável todos os reagentes e materiais após sua utilização. Obedeça todas as normas nacionais relevantes para o descarte.

8. Coleta e armazenamento de amostra

As amostras de urina devem ser coletadas em recipientes padronizados limpos e podem ser armazenadas por até 24 horas em temperatura ambiente ou entre 2 a 8 °C antes do uso. Além disso, é possível armazená-las a 2-8 °C por mais 3 dias. Se for necessário o armazenamento por um período maior antes do uso, as amostras de urina devem ser armazenadas a -20 °C.

Evite congelar e descongelar a amostra repetidamente. As amostras de urina não devem ser coletadas em recipientes de transporte que contenham meios de transporte com conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, uma vez que esses materiais podem interferir no teste RIDASCREEN® Legionella ELISA.

9. Realização do teste

9.1. Geral

Todos os reagentes e a placa de microtitulação **Plate** devem estar em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) antes do uso. As tiras de microtitulação não devem ser removidas da embalagem de alumínio até que tenham chegado à temperatura ambiente. Os reagentes devem ser completamente misturados imediatamente antes do uso. Após o uso, as tiras de microtitulação (colocadas em embalagens seladas) e os reagentes devem ser armazenados novamente a 2-8 °C. Uma vez usadas, as tiras de microtitulação não devem ser reutilizadas. Os reagentes e as tiras de microtitulação não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou se os frascos estiverem vazando.

Para evitar a contaminação cruzada, deve-se evitar que as amostras entrem em contato direto com os componentes do kit.

O teste não deve ser realizado sob luz solar direta. Recomendamos cobrir a placa de microtitulação ou selá-la com uma embalagem plástica para evitar perdas ocasionadas pela evaporação.

9.2. Preparação das amostras

Toda a urina deve ser completamente misturada e poderá então ser usada para o teste, sem a necessidade de diluição.

Quaisquer cristais de sal que ocorram durante o armazenamento das amostras de urina devem ser completamente dissolvidos, aquecendo-as a 37 °C, antes que possam ser usadas no teste.

As urinas que contiverem partículas, por qualquer motivo, devem ser filtradas antes do uso.

9.3. Primeira incubação

Após a inserção de um número suficiente de poços no suporte de tiras, adicione 100 µL do controle positivo **Control | +**, controle negativo **Control | -** ou da amostra de urina. Adicione então 100 µL do anticorpo conjugado com biotina **Conjugate | 1** e misture (batendo levemente na lateral da placa), então incube por 60 minutos em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).

9.4. Lavagem

A lavagem cuidadosa é importante para obter resultados corretos e deve, portanto, ser realizada estritamente de acordo com as instruções. A substância incubada nos poços deve ser esvaziada em um recipiente de dejetos para descarte, de acordo com as normas oficiais. Após essa etapa, bata a placa em papel absorvente para remover a umidade residual. Lave então a placa cinco vezes, usando 300 µl de tampão de lavagem a cada vez. Certifique-se que os poços estejam completamente vazios, batendo neles após cada lavagem em uma parte do papel absorvente que ainda esteja seca e não utilizada.

Se uma lavadora de microplacas ou ELISA completamente automatizada for utilizada, certifique-se que a máquina esteja ajustada corretamente, ou solicite as configurações ao fabricante, se necessário. As ferramentas fornecidas pela R-Biopharm já são programadas com configurações e protocolos de trabalho validados. Apenas amostras de urina livres de partículas devem ser usadas, de acordo com as instruções de preparação de amostra (veja 9.2.) para evitar o bloqueio das agulhas de lavagem. Certifique-se também de que todo o líquido seja aspirado durante cada estágio da lavagem.

9.5. Segunda incubação

Utilize uma pipeta para encher 100 µL de conjugado com poliperoxidase **Conjugate | 2** nos poços, então incube por 30 minutos em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).

9.6. Lavagem

Lave do modo descrito em 9.4.

9.7. Terceira incubação

Preencha todos os poços com 100 µl de substrato **Substrate** . Então incube a placa por 15 minutos no escuro, em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). Subseqüentemente, preencha todos os poços com 50 µL de reagente de parada **Stop** para parar a reação. Após misturar cuidadosamente, batendo levemente na lateral da placa, meça a extinção em 450 nm (opcional: 450/620 nm). Ajuste o ponto zero no ar, ou seja, sem a placa de microtitulação.

10. Controle de qualidade - indicações da expiração do reagente

Para propósito de controle de qualidade, os controles positivo e negativo devem ser usados todas as vezes que o teste for realizado, para garantir que os reagentes estejam estáveis e que

o teste seja realizado corretamente. O teste foi realizado corretamente se a taxa de extração para o controle negativo for menor que 0,2 a 450 nm (menos que 0,160 a 450/620 nm) e o valor para o controle positivo for maior que 0,8 a 450 nm ou 450/620 nm. Um valor maior que 0,2 (0,160) para o controle negativo pode indicar que a lavagem não foi suficiente. O desvio dos valores necessários, assim como uma coloração turva ou azulada do substrato incolor antes que seja colocado nos poços, pode indicar que os reagentes estão fora do prazo de validade.

Se os valores estipulados não forem obtidos, os seguintes pontos devem ser verificados antes da repetição do teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- A funcionalidade dos equipamentos utilizados (p. ex., a calibração)
- A execução correta do teste
- Inspeção visual dos componentes do kit, à procura de contaminação ou vazamentos – uma solução de substrato que ficou azul não deve ser usada.

Se as condições ainda não tiverem sido atingidas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do limite

Para estabelecer o limite, unidades de extinção de 0,15 são adicionadas à extinção medida para o controle negativo.

$$\text{Limite} = \text{taxa de extinção para o controle negativo} + 0,15$$

11.2. Resultado do teste

A avaliação da amostra é positiva se a taxa de extinção for mais que 10 % maior que o valor limite calculado.

A avaliação da amostra é marginal e o teste precisa ser repetido se a taxa de extinção variar entre 10 % menos a 10% mais do que o valor limite. Se o exame repetido com uma amostra de urina frescas ficar novamente na zona cinzenta, a amostra deve ser considerada negativa.

As amostras que estiverem mais do que 10% abaixo do limite calculado devem ser consideradas negativas.

12. Limitações do método

O teste RIDASCREEN® Legionella detecta o antígeno solúvel de bactérias Legionella em amostras de urina. Não é possível associar o nível de extinção determinado com a ocorrência ou severidade dos sintomas clínicos. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sinais clínicos e com os sintomas.

Um resultado positivo não descarta a presença de outros patógenos infecciosos.

Um resultado negativo não descarta a possibilidade de uma infecção por *Legionella*. Tal resultado pode ser devido à excreção intermitente do patógeno na urina, ou a quantidade de antígeno na amostra pode ser muito pequena. Se o histórico do paciente levantar a suspeita de infecção por *Legionella pneumophila*, o exame deve ser repetido com outra amostra de urina.

Um resultado limítrofe pode ser devido à distribuição não-homogênea dos antígenos na amostra de urina. Nesses casos, o teste deve ser repetido com uma segunda amostra ou outra amostra da urina do paciente deve ser solicitada para exame.

13. Características de desempenho

13.1. Qualidade do teste

Um estudo de validação retrospectivo com RIDASCREEN® Legionella ELISA Legionella ELISA examinou 100 amostras de urina. Essas amostras foram levadas para exames de diagnóstico de rotina no Laboratório de Referência em Legionella em Dresden, Alemanha, onde foram então preservadas a -20 °C. Após o descongelamento, as amostras foram submetidas a exame comparativo com RIDASCREEN® Legionella ELISA e um outro ELISA comercial. Os resultados do estudo estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Correlação entre RIDASCREEN® Legionella ELISA e outro ELISA comercial

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

Correspondência positiva: 95,2 %

Correspondência negativa: 90,9 %

13.2. Reatividade cruzada

Diversos organismos patogênicos foram investigados com RIDASCREEN® Legionella ELISA e não mostraram reatividade cruzada, exceto pelo *S. aureus*. Esses estudos foram realizados com suspensões bacterianas que mostraram ter concentrações de 10⁶ a 10⁹ organismos por mL. Antígenos e sobrenadantes de cultura de vírus estão adequadamente listados. Os resultados desse estudo estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Reatividade cruzada com micro-organismos patogênicos

Organismo	Origem	Valor médio [OD 450/620]
Adenovírus	Sobrenadante de cultura celular	0,005
<i>Bacillus cereus</i>	Cultura	0,118
<i>Campylobacter coli</i>	Cultura	0,131
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultura	0,068
<i>Candida albicans</i>	Cultura	0,043
<i>Candida glabrata</i>	Cultura	0,023
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultura	0,047
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Cultura	0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultura	0,046
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultura	0,097
<i>Escherichia coli</i>	Cultura	0,057
<i>Haemophilus influenzae</i>	Cultura	0,019
Influenza A/Pequim	Antígeno para ELISA	0,011
Influenza A/Sydney	Antígeno para ELISA	0,010
Influenza B/Harbin	Antígeno para ELISA	0,020
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0,035
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Antígeno para ELISA	0,022
Vírus Parainfluenza	Antígeno para ELISA	0,093
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0,020
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultura	0,038
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0,023
Vírus sincicial respiratório	Antígeno para ELISA	0,050
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultura	0,066
<i>Serratia marcescens</i>	Cultura	0,007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura	3,579
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultura	0,041
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cultura	0,020
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cultura	0,049
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cultura	0,045

13.3. Precisão

A reprodutibilidade do RIDASCREEN® Legionella ELISA foi testada com seis referências, representando a faixa de medição completa, de fraco a alto positivo. 40 réplicas dessas referências foram testadas para determinar a reprodutibilidade intraensaios. Os valores médios e os coeficientes de variação (CV) foram determinados para três lotes. Para a reprodutibilidade entre ensaios, as referências de 10 diferentes dias de trabalho foram examinadas em duplicatas, com 2 execuções por dia. As medições foram determinadas em 3 lotes por 6 técnicos. A reprodutibilidade entre lotes foi determinada para todos os 3 lotes. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados da reprodutibilidade/precisão do RIDASCREEN® Legionella ELISA

Referências		Intraensaio			Entre-ensaio			Entre-lote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1–3 do kit
1	VM	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	VM	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	VM	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	VM	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	VM	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	VM	0,003	0,000	0,007	0,008	0,001	0,008	0,006
	CV (%)	n/a						

13.4. Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do RIDASCREEN® Legionella ELISA, o limite de branco (LoB) foi analisado em 270 ensaios de amostras negativas de urina, e o limite de detecção (LoD) foi analisado em 90 ensaios. Os resultados dessas medições são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da sensibilidade analítica do RIDASCREEN® Legionella ELISA

	VM [OD 450/620]	ng/mL
LoB	0,041	–
LoD	0,060	1,5

13.5. Substâncias interferentes

A seguinte lista de substâncias não mostrou efeitos nos resultados dos testes quando misturadas com amostras de urina negativas e positivas para Legionella nas concentrações descritas:

Sangue humano (10 % v/v), amoxicilina (antibiótico; 0,72 % p/v), acetaminofeno (analgésico; 1,08 % p/v), xarope para tosse contendo codeína (0,25 % v/v), albumina (0,5 % p/v), glicose (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). A levofloxacina mostrou uma redução relacionada a dose dos valores de OD se tiver sido misturada com a urina em uma concentração correspondente a 2 a 3 vezes a dose diária.

Apêndice

Símbolos específicos do teste:

Plate	Placa de micropoços
Wash	Tampão de lavagem
Control +	Controle positivo
Control -	Controle negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente de parada

Referências

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