

RIDA[®] QUICK Legionella

N.º producto: N8003



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, D-64297 Darmstadt, Alemania
Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. RIDA®QUICK Legionella es un ensayo inmunocromatográfico rápido 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*, se encuentran dos que son patógenos humanos importantes. La infección por *L. pneumophila* provoca principalmente 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 Pontiac.³

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 infección son *L. micdadei*, *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 de la Legión Americana en Filadelfia (EE.UU.), donde tomó el nombre de «enfermedad del legionario». Se produjeron otros dos brotes más recientes 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. La enfermedad del legionario puede afectar a personas de cualquier edad, 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}. La prueba rápida RIDA®QUICK Legionella es especialmente adecuada para la detección de antígenos solubles de *Legionella* en la orina de pacientes infectados con *Legionella*

pneumophila del serogrupo 1, así como para la detección de serogrupos menos frecuentes de *Legionella pneumophila*.

3. Principio de la prueba

Esta prueba rápida es una prueba inmunocromatográfica de flujo lateral bajo y de una etapa que utiliza anticuerpos anti-*Legionella* tanto biotinilados como marcados con oro. En cuanto aparece una muestra positiva para antígeno de *Legionella*, los complejos inmunes desarrollan anticuerpos anti-*Legionella* marcados, los cuales atraviesan la membrana. La estreptavidina de la línea de prueba T se une a los complejos inmunes a través de la biotina emparejada a los anticuerpos anti-*Legionella*, de modo que se produce una coloración rojo-violeta de la línea T. Los anticuerpos no ligados y marcados con oro se unen a la siguiente línea de control C. En caso de muestra negativa, no se produce una formación de complejos inmunes marcados con oro en la línea T, sino solo en la línea C. La línea C roja siempre muestra si el proceso de prueba era válido.

4. Contenido del envase

Los reactivos del kit son suficientes para 25 ensayos.

Cassette	25 ensayos	25 ensayos de análisis envasados individualmente
Reagent A	13,5 ml	Anticuerpos específicos anti- <i>legionella</i> ; contiene 0,05% de azida, lista para usar y de color azul
Reagent B	13,5 ml	Anticuerpos específicos anti- <i>legionella</i> ; contiene 0,05% de azida, lista para usar y de color amarillo
Pipette	25 unidades	Bolsa con 25 pipetas desechables
Reagent vial	25 unidades	Bolsa con 25 recipientes de reacción
Pipet Tip	100 unidades	4 bolsas, cada una con 25 puntas de pipeta
Microlit Pipet	1 unidad	Pipeta para volúmenes de 100 µl

5. Instrucciones de almacenamiento de los reactivos

El envase debe almacenarse a 2 - 25 °C y puede utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad. Tampoco puede garantizarse la validez de los ensayos si el envase de los ensayos está dañado.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

- Agitador vórtex (opcional)
- Recipiente para residuos de laboratorio con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %

7. Medidas de precaución

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio capacitado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.

Los reactivos contienen azida de sodio como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

No pipetear muestras ni reactivos con la boca. Evitar el contacto con heridas de la piel o membranas mucosas. Utilizar guantes desechables para manipular las muestras y lavarse las manos al terminar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse como tal con desinfectantes adecuados (p. ej., hipoclorito de sodio) o esterilizarse a 121 °C en el autoclave durante por lo menos una hora.

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 RIDA[®]QUICK Legionella.

9. Procedimiento de ensayo

9.1. General

Las muestras, los reactivos y los ensayos deben adquirir temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de la utilización. Los casetes de prueba deben extraerse del envase adicional poco antes de su uso. No reutilizar los casetes una vez utilizados. No realizar la prueba bajo la luz solar directa. No devolver los reactivos sobrantes a los recipientes por riesgo de contaminación.

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. Cómo preparar las pruebas de la muestra

Téngase en cuenta:

Utilizar una nueva **Pipet Tip** punta de pipeta para cada paso de pipeteo.

Añadir 100 µl de reactivo A **Reagent A** y reactivo B **Reagent B** a un recipiente de reacción marcado **Reagent vial**. A continuación, 2 x 100 µl de la muestra de orina que debe examinarse y prepararse de acuerdo con lo indicado en 9.2 se añaden a la mezcla de reactivos del recipiente de reacción **Reagent vial** compuesta por el reactivo A y el reactivo B.

Debe cerrarse bien el recipiente de reacción **Reagent vial** y el contenido debe estar bien mezclado (opcional: agitación). Posteriormente, introducir el recipiente de reacción **Reagent vial** en el inserto de reactivos del kit de prueba y dejar reaccionar la mezcla durante 10 min a TA y permitir que los sólidos sedimenten.

9.4. Prueba de la muestra

Extraer el casete de prueba **Cassette** del envase adicional y colocar sobre una superficie plana. A continuación, colocar una nueva punta de pipeta **Pipet Tip** en la pipeta Microlit **Microlit Pipet** y tomar 100 µl en exceso de la mezcla de reactivos de orina y pipetear en el campo de aplicación del casete de prueba. Asegúrese de que el líquido pueda fluir a través de la membrana sin dificultad. Si se realiza correctamente, aparecerá la banda de control en la línea de control C después de aproximadamente 1,5 minutos. Si la línea de control todavía no resulta visible después de 1,5 minutos, deberá centrifugarse la muestra durante 5 minutos a 5000 g para que sedimenten todas las partículas sólidas de la muestra que afectan a la prueba, antes de añadir esto a una mezcla recién hecha de reactivo A y reactivo B. El resultado de la prueba siempre puede leerse después de **10 minutos**. El color de las bandas y su intensidad puede cambiar de rojo-violeta a azul a gris-violeta durante toda la fase de desarrollo y después del secado de la tira.

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

Se debe evaluar la prueba solo si el casete de prueba no presenta daños antes de pipetear la suspensión de la muestra y si no se observan cambios de color o en las bandas. Asimismo, después de un período de incubación de 10 minutos, deben observarse las bandas de control rojo-violeta. Si no aparecen, antes de repetir la prueba, debe probarse lo siguiente:

- Período de validez de los casetes de prueba y de los reactivos utilizados
- Procedimiento correcto de la prueba
- Contaminación de los reactivos

Si después de una repetición de la prueba con un casete nuevo, las bandas de control continúan sin ser visibles, póngase en contacto con el fabricante o con su distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

Deben aparecer un máximo de dos bandas, vistas en el campo de aplicación de la muestra, con la secuencia siguiente: Una banda de reacción de color rojo-violeta en la línea T de la prueba y una banda de control rojo-violeta en la línea **C** de control. Si la banda de control no aparece, no puede evaluarse la prueba y será no válida.

Pueden darse las interpretaciones siguientes:

- **Positivo para *Legionella*:** Se observan ambas bandas.
- **Negativo para *Legionella*:** solo se observa la banda de control.
- **No válido:** no se observa ninguna banda o se observa una opción distinta a las anteriormente citadas. De modo similar, las coloraciones de bandas que aparecen mucho más tarde de 10 minutos no tienen valor diagnóstico y no deben evaluarse.

12. Limitaciones del método

RIDA[®]QUICK Legionella prueba antígenos solubles específicos de *Legionella pneumophila* en muestras de orina. No puede asociarse la intensidad de las bandas específicas visibles a la aparición o gravedad de 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 o causas.

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

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad y especificidad clínicas

Un estudio de validación retrospectivo con RIDA[®]QUICK Legionella estudió 100 muestras. Estas muestras se tomaron para el 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 RIDA[®]QUICK Legionella y otra prueba comercialmente disponible. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Correlación entre RIDA®QUICK Legionella y otra prueba rápida comercial

		Prueba rápida	
		Positivo	Negativo
RIDA®QUICK Legionella	Positivo	44	7
	Negativo	1	44

Coincidencia de positivos: 91,7%

Coincidencia de negativos: 91,7%

13.2. Precisión

Para determinar la precisión de las pruebas RIDA®QUICK Legionella, se estudió la reproducibilidad intraensayos (10 reproducciones / 1 día / 1 operador / 1 lote), la reproducibilidad interensayos (3 reproducciones / 10 días / 1 operador / 1 lote), la reproducibilidad interoperadores (3 reproducciones / 1 día / 3 operadores / 1 lote) y la reproducibilidad interlotes (3 reproducciones / 1 día / 1 operador / 3 lotes). Se midieron 5 referencias en cada análisis: un negativo, dos positivos débiles y dos positivos medios. La prueba RIDA®QUICK Legionella muestra los resultados esperados en el 100% de las mediciones.

13.3. Reactividad cruzada

Se estudiaron diferentes gérmenes patógenos del tracto intestinal con el ensayo RIDA®QUICK Legionella y, con la excepción de *Staphylococcus aureus* (utilizado con una concentración de $1,6 \times 10^7$ KBE/ml), no se produjo reactividad cruzada. Los análisis se realizaron con suspensiones de bacterias (10^6 a 10^9 KBE/ml), con sobrenadantes de cultivos de células infectadas con virus y con preparaciones de antígenos para uso en ELISA. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Gérmenes con posibilidad de reacción cruzada en RIDA®QUICK Legionella

Microorganismo	Origen	Resultados
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivo	Negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Cultivo	Negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultivo	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Cultivo	Negativo
<i>Candida glabrata</i>	Cultivo	Negativo
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Cultivo	Negativo

<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	Negativo
<i>Haemophilus influenza</i>	Cultivo	Negativo
Gripe A/Beijing	AG para ELISA	Negativo
Gripe A/Sydney	AG para ELISA	Negativo
Gripe B/Harbin	AG para ELISA	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultivo	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	AG para ELISA	Negativo
Virus paragripal	AG para ELISA	Negativo
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultivo	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	Negativo
Virus respiratorio sincicial	AG para ELISA	Negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultivo	Negativo
<i>Serratia marcescens</i>	Cultivo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo	Positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	Negativo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cultivo	Negativo
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cultivo	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cultivo	Negativo

13.4 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:

amoxicilina (antibiótico; 0,72% p/v), levofloxacino (antibiótico; 0,15% p/v), eritromicina (antibiótico; 0,06% p/v), sangre humana (10% v/v), paracetamol (antibiótico; 1,08% p/v), albúmina (0,5% p/v), jarabe para la tos (0,25% v/v), glucosa (2,0% v/v), ácido ascórbico (vitamina C; 0,1% v/v), bilirrubina (0,02% v/v), ácido bórico (0,26% p/v).

13.5 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de RIDA[®]QUICK Legionella fue determinada por 2 operadores en 2 lotes diferentes del producto, y el resultado fue de aproximadamente 6,0 ng de antígeno de *Legionella*/ml analizando una dilución seriada. El límite de detección de 6,0 ng/ml se confirmó con 60 mediciones durante 5 días en 2 lotes por 2 operadores, con un 100% de resultados positivos.

Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Cassette	Casete de prueba
Reagent A	Reactivo A
Reagent B	Reactivo B
Reagent vial	Recipiente de reacción
Pipet Tip	Punta de pipeta
Microlit Pipet	Micropipeta 100 µl

Bibliografia

1. Howden B.P. et al.: Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal* (2003) 33 (11): 484–488.
2. Benin A.L. 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 B.P. et al.: Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *J Clin Microbiol* (1979) 9: 575-578
6. Kohler R.B. et al.: Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* (1984) 20: 605-607