

RIDA[®] QUICK Legionella

Codice prodotto: N8003



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



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA®QUICK Legionella è un test immunocromatografico rapido per la rilevazione qualitativa degli antigeni di *Legionella pneumophila* nei campioni di urina.

2. Sintesi e spiegazione del test

Il ceppo della *Legionella* appartiene alla famiglia delle *Legionellaceae* ed è suddiviso in 40 specie con oltre 70 sierogruppi. I batteri Legionella sono batteri facoltativi, intracellulari gram-negativi il cui tasso d'infezione raggiunge il picco d'estate e all'inizio dell'autunno. Con la malattia del legionario si distingue tra infezioni acquisite esternamente a causa di viaggi e infezioni nosocomiali. Negli Stati Uniti, il tasso di mortalità delle infezioni nosocomiali è del 15 - 20%.^{1,2} In Europa, il 12% di tutti i casi della malattia del legionario è fatale. Il gran numero di specie di *Legionella* ne include due che sono importanti patogeni umani. L'infezione da *L. pneumophila* dà origine principalmente alla malattia del legionario (nota anche come legionellosi) e quella da *L. longbeachae* provoca la febbre di Pontiac. La febbre di Pontiac è una malattia acuta autolimitante simile all'influenza, ma senza l'insorgenza di polmonite. Circa il 7% dei pazienti che soffrono della malattia del legionario sviluppa la febbre di Pontiac.³

La *L. pneumophila* ha 16 sierogruppi; più del 70% delle infezioni da *Legionella* in Europa è provocato dal sierogruppo 1 della *L. pneumophila*. Altri ceppi che possono provocare l'infezione da *Legionella* comprendono la *L. micdadei*, la *L. bozemanii*, la *L. dumoffii* e la *L. longbeachae*.⁴

La malattia del legionario è un'infezione respiratoria acuta causata principalmente dalla *L. pneumophila*. Fu descritta per la prima volta nel 1976 durante un congresso dell'American Legion tenuto a Philadelphia, Stati Uniti, dove la malattia del legionario ricevette il suo nome. Altre due epidemie della malattia del legionario, con un totale di 6 decessi, si verificarono nel 2013 a Brisbane, in Australia, e a Reynoldsburg, in Ohio. I sintomi sono febbre, tosse (secca o produttiva di espettorato) e brividi. Altri sintomi meno frequenti sono diarrea, vomito, bradicardia e iponatremia.³ Possono essere infettati dalla malattia del legionario soggetti di ogni età, ma gli anziani, i fumatori e i pazienti affetti da disturbi polmonari cronici sono più esposti a tale infezione. Perfino in paesi dotati di un sistema sanitario efficiente, fino al 90% dei casi di malattia del legionario non viene diagnosticato poiché i sintomi clinici sono molto vaghi e la patologia si presenta piuttosto raramente. Inoltre, è difficile distinguere la malattia del legionario da altre forme di polmonite unicamente sulla base di sintomi o di esami radiologici.

La rilevabilità molto precoce di antigeni solubili che sono specifici della *Legionella* nell'urina di pazienti affetti dalla malattia del legionario rende l'urina una matrice ideale dell'esame per stadi di legionellosi precoci nonché più avanzati^{5,6}. Il test rapido RIDA®QUICK Legionella è particolarmente adatto per la rilevazione dell'antigene solubile della Legionella nell'urina di pazienti che si sono infettati con *Legionella pneumophila* del sierogruppo 1, nonché per la rilevazione di sierogruppi di *Legionella pneumophila* che si presentano più raramente.

3. Principio del test

Il presente test rapido è un test immunocromatografico a fase singola e flusso laterale, che utilizza sia anticorpi biotinilati sia anticorpi anti Legionella contrassegnati con particelle d'oro. Non appena vi è un campione positivo all'antigene della Legionella, i complessi immunitari si formano con gli anticorpi anti Legionella contrassegnati, che attraversano la membrana. La streptavidina situata sulla linea di positività T lega i flussi di complessi immunitari tramite la biotina accoppiata agli anticorpi anti Legionella e determina quindi una colorazione rosso violaceo della linea T. Gli anticorpi continui non complessati, contrassegnati con particelle d'oro, si legano alla successiva linea di controllo C. Nel caso di campione negativo, non si formano complessi immunitari contrassegnati con particelle d'oro sulla linea T, ma solo sulla linea C. La linea C rossa indica sempre se l'esecuzione del test è stata valida.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 25 test.

Cassette	25 test	25 test confezionati singolarmente
Reagent A	13,5 ml	Anticorpi specifici anti Legionella; contiene 0,05% azoturo, pronto per l'uso, di colore blu
Reagent B	13,5 ml	Anticorpi specifici anti Legionella; contiene 0,05% azoturo, pronto per l'uso, di colore giallo
Pipette	25 unità	Busta con 25 pipette monouso
Reagent vial	25 unità	Busta con 25 contenitori di reazione
Pipet Tip	100 unità	4 buste, ciascuna con 25 puntali
Microlit Pipet	1 unità	Pipetta per volumi di 100 µl

5. Istruzioni di conservazione per reagenti

La confezione può essere conservata a 2 - 25 °C e utilizzata fino alla data di scadenza stampata. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità. Analogamente, l'utilizzabilità dei test non può più essere garantita se la confezione dei test è danneggiata.

6. Reagenti necessari supplementari - attrezzatura necessaria

- Vorticolatore (opzionale)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5 %

7. Misure precauzionali

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

I reagenti contengono azoturo di sodio come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le mucose.

Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati esattamente come questi ultimi con adeguati disinfettanti (ad es. ipoclorito di sodio) o sottoposti a sterilizzazione a vapore per almeno un'ora a 121 °C.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

I campioni di urina devono essere raccolti in contenitori standard puliti e possono essere conservati per un massimo di 24 ore a temperatura ambiente o a 2 - 8 °C prima dell'uso. Inoltre, è possibile la conservazione a 2 - 8 °C per altri 3 giorni. Qualora prima dell'uso sia necessaria una conservazione prolungata, i campioni di urina devono essere conservati a -20 °C. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione. I campioni di urina non devono essere raccolti in contenitori per il trasporto che contengano mezzi di trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDA[®]QUICK Legionella.

9. Esecuzione del test

9.1. Informazioni generali

I campioni, i reagenti e i test devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le cassette dei test devono essere estratte dalla confezione aggiuntiva poco prima dell'uso. Una volta utilizzate, le cassette non devono essere riutilizzate. Il test non deve essere esposto all'irradiazione solare diretta. I reagenti in eccesso non devono essere rimessi nei contenitori di reazione per evitare contaminazioni.

9.2. Preparazione dei campioni

Tutta l'urina deve essere mescolata accuratamente e può poi essere usata per il test senza diluizione.

Eventuali cristalli salini che si presentano durante la conservazione dei campioni di urina devono essere completamente sciolti mediante riscaldamento a 37 °C prima di potere usare l'urina nel test.

L'urina che per qualsiasi motivo contenga particelle deve essere filtrata prima dell'uso.

9.3. Preparazione dei test per i campioni

Nota:

Per ogni fase della procedura di pipettaggio deve essere usato un puntale nuovo [Pipet Tip].

100 µl di reagente A [Reagent A] e reagente B [Reagent B] vengono aggiunti a un contenitore di reazione contrassegnato [Reagent vial]. Successivamente 2 x 100 µl della stessa urina da esaminare, preparata seguendo le indicazioni del punto 9.2, si aggiunge alla miscela di reagenti nel contenitore di reazione [Reagent vial] composta dal reagente A e dal reagente B.

Il contenitore di reazione [Reagent vial] dev'essere ben chiuso e il contenuto dev'essere ben miscelato (opzionale: con vorticolatore). Inserire poi il contenitore di reazione [Reagent vial] nell'inserito reagente nel kit del test; far reagire la miscela per 10 minuti a temperatura ambiente e far sedimentare eventuali solidi.

9.4. Test dei campioni

La cassetta del test [Cassette] estratta dalla confezione aggiuntiva viene collocata su una superficie piana. In seguito, si colloca un nuovo puntale [Pipet Tip] sulla pipetta Microlit [Microlit Pipet] e si preleva l'eccesso di 100 µl dalla miscela di reagente e urina e si pipetta nel campo di applicazione della cassetta del test. Assicurarsi che il liquido possa fluire attraverso la membrana senza difficoltà. Se il procedimento viene eseguito correttamente, la banda di controllo sulla linea di controllo C appare dopo circa 1,5 minuti. Se la linea di controllo non è ancora visibile dopo 1,5 minuti, il campione deve essere centrifugato per 5 min. a 5000 g prima di aggiungerlo a una miscela preparata di reagente A e reagente B, al fine di lasciare sedimentare eventuali particelle solide di disturbo presenti nel campione. Il risultato del test può sempre essere letto dopo **10 minuti**. La colorazione delle bande e la loro intensità può variare dal rosso violaceo al blu al grigio violaceo durante l'intera fase di sviluppo e una volta asciugatasi la striscia.

10. Controllo della qualità – indicazioni della scadenza dei reagenti

Il test dev'essere valutato solo se la cassetta del test è intatta prima di pipettare la sospensione del campione e se non sono visibili alterazioni del colore o delle bande. Inoltre, dopo un periodo di incubazione di 10 minuti, devono essere visibili le bande di controllo rosso violacee. In caso contrario, prima di ripetere il test controllare i seguenti punti:

- durata di conservazione delle cassette del test e dei reagenti utilizzati
- esecuzione del test corretta
- contaminazione dei reagenti

Se, dopo la ripetizione del test con una nuova cassetta le bande di controllo non sono ancora visibili, rivolgersi al produttore o al distributore R-Biopharm della propria zona.

11. Valutazione e interpretazione

Devono apparire al massimo due bande, viste dal campo di applicazione del campione, nella sequenza qui indicata: una banda di reazione rosso violacea sulla linea di positività T e una banda di controllo rosso violacea sulla linea di controllo **C**. Se la banda di controllo non è presente, il test non può essere valutato e non è valido!

Sono possibili le seguenti interpretazioni:

- **positivo alla Legionella:** entrambe le bande sono visibili;
- **negativo alla Legionella:** è visibile solo la banda di controllo;
- **non valido:** non sono visibili bande o una costellazione diversa da quella citata sopra. Analogamente, le alterazioni del colore delle bande che appaiono solo molto più tardi di 10 minuti non hanno valore diagnostico e non devono essere valutate.

12. Limiti del metodo

Il test RIDA[®]QUICK Legionella rileva la presenza di antigeni solubili specifici di *Legionella pneumophila* in campioni di urina. Non è possibile associare l'intensità delle bande specifiche visibili alla presenza o alla gravità dei sintomi clinici. **I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati tenendo conto dei segni e dei sintomi clinici.**

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri patogeni infettivi o altre cause.

Un risultato **negativo** non esclude la possibilità di un'infezione da Legionella. Un risultato simile può essere dovuto all'escrezione intermittente di antigeni solubili oppure è possibile che la quantità di antigene nel campione di urina sia insufficiente. Qualora l'anamnesi dia luogo al sospetto di infezione dovuta al patogeno in questione, l'esame deve essere ripetuto con un ulteriore campione di urina.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1. Sensibilità e specificità clinica

Uno studio di validazione retrospettiva con il test RIDA[®]QUICK Legionella ha esaminato 100 campioni. Questi campioni sono stati prelevati per una diagnosi di routine condotta dal Laboratorio di riferimento per la Legionella di Dresda, in Germania, dove sono stati poi conservati a -20 °C. Dopo lo scongelamento, i campioni sono stati sottoposti a esame comparativo con RIDA[®]QUICK Legionella e con un ulteriore test rapido commerciale. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 1.

Tabella 1: Correlazione tra RIDA®QUICK Legionella e un altro test rapido commerciale

		Test rapido	
		Positivo	Negativo
RIDA®QUICK Legionella	Positivo	44	7
	Negativo	1	44

Riscontro positivo: 91,7 %

Riscontro negativo: 91,7 %

13.2. Precisione

Per determinare la precisione dei test RIDA®QUICK Legionella, sono state esaminate la riproducibilità intra-test (10 repliche / 1 giorno / 1 operatore / 1 lotto), la riproducibilità inter-day (3 repliche / 10 giorni / 1 operatore / 1 lotto), la riproducibilità inter-operatore (3 repliche / 1 giorno / 3 operatori / 1 lotto) e la riproducibilità inter-lotto (3 repliche / 1 giorno / 1 operatore / 3 lotti). Per ogni esame sono stati misurati 5 riferimenti: uno negativo, due bassi positivi e due medi positivi. Il test RIDA®QUICK Legionella indica i risultati attesi nel 100% delle misurazioni.

13.3. Reattività incrociata

Diversi germi patogeni del tratto intestinale sono stati esaminati con il test RIDA®QUICK Legionella e, fatta eccezione per lo *Staphylococcus aureus* (utilizzato in una concentrazione di $1,6 \times 10^7$ CFU/ml), non ha comportato alcuna reattività incrociata. Gli esami sono stati eseguiti con sospensioni batteriche (da 10^6 a 10^9 CFU/ml), con supernatanti di colture cellulari di cellule infettate da virus e con i preparazioni di antigene da utilizzare nel test ELISA. I risultati di questo studio sono elencati nella Tabella 2.

Tabella 2: Potenziali germi a reattività crociata nel test RIDA®QUICK Legionella

Organismo	Origine	Risultati
Adenovirus	Supernatante di coltura cellulare	Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Coltura	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Coltura	Negativo
<i>Candida glabrata</i>	Coltura	Negativo
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Coltura	Negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Coltura	Negativo

<i>Enterobacter cloacae</i>	Coltura	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coltura	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Coltura	Negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	Coltura	Negativo
Influenza A/Pechino	AG per ELISA	Negativo
Influenza A/Sydney	AG per ELISA	Negativo
Influenza B/Harbin	AG per ELISA	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coltura	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	AG per ELISA	Negativo
Virus della parainfluenza	AG per ELISA	Negativo
<i>Proteus mirabilis</i>	Coltura	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Coltura	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coltura	Negativo
Virus respiratorio sinciziale	AG per ELISA	Negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Coltura	Negativo
<i>Serratia marcescens</i>	Coltura	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coltura	Positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coltura	Negativo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Coltura	Negativo
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Coltura	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Coltura	Negativo

13.4 Sostanze interferenti

Le sostanze incluse nell'elenco seguente non hanno mostrato effetti sui risultati dei test quando miscelate in campioni di urina positivi e negativi alla Legionella nelle concentrazioni descritte: amoxicillina (antibiotico; 0,72 % p/v), levofloxacina (antibiotico; 0,15 % p/v), eritromicina (antibiotico; 0,06% p/v), sangue umano (10 % v/v), acetaminofene (antibiotico; 1,08 % p/v), albumina (0,5 % p/v), sciroppo per la tosse (0,25% v/v), glucosio (2,0 % v/v), acido ascorbico (vitamina C; 0,1 % v/v), bilirubina (0,02 % v/v), acido borico (0,26 % p/v).

13.5. Sensibilità analitica

Esaminando una serie di diluizione, 2 operatori in 2 diversi lotti di prodotto hanno determinato che la sensibilità analitica del test RIDA[®]QUICK Legionella è di circa 6,0 ng/ml di antigene della Legionella. Il limite di rilevazione di 6,0 ng/ml è stato confermato attraverso 60 misurazioni effettuate nell'arco di 5 giorni in 2 lotti da 2 operatori con il 100 % di risultati positivi.

Appendice

Simboli specifici nel testo:

Cassette	Cassetta del test
Reagent A	Reagente A
Reagent B	Reagente B
Reagent vial	Contenitore di reazione
Pipet Tip	Puntale per pipette
Microlit Pipet	Micropipetta da 100 µl

Riferimenti

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