



**Gebrauchsanweisung**  
**Instructions for use**  
**Instructions d'utilisation**  
**Instrucciones de uso**  
**Istruzioni per l'uso**  
**Instrukcja obsługi**

# **NADAL<sup>®</sup> Legionella**

## **Urine Antigen Test**

**(test cassette)**

# **REF 552005**



Version 1.0

2010-06-04



nal von minden GmbH  
Schikanederstraße 2 a  
D-93053 Regensburg

nal von minden GmbH  
Carl-Peschken-Str. 9  
D-47441 Moers

nal von minden GmbH  
Laan van Waalhaven 305  
NL-2497 Den Haag

[www.nal-vonminden.de](http://www.nal-vonminden.de)  
[info@nal-vonminden.de](mailto:info@nal-vonminden.de)

DE	Gebrauchsanweisung .....	3
EN	Instructions for use .....	5
FR	Instructions d'utilisation .....	7
E	Instrucciones de uso .....	9
I	Istruzioni per l'uso .....	11
PL	Instrukcja obsługi .....	13
	Symbols .....	15
	Contacts .....	19

## 1. Verwendungszweck

Der NADAL<sup>®</sup> Legionella Urin Antigen Test ist ein immunochromatografischer *in vitro* Schnelltest zum qualitativen Antigen-Nachweis von *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 im humanen Urin. Der Test unterstützt die Erstellung der vorläufigen Diagnose der Legionärskrankheit bei Patienten mit Anzeichen und Symptomen von Pneumonien in Verbindung mit einer Kultur und anderen Methoden.

## 2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

*Legionella pneumophila* Serogruppe 1 ist ein aerobes, gram-negatives Bakterium, das die Form kurzer Stäbchen hat. *Legionella pneumophila* ist der Auslöser von Pontiac-Fieber und der Legionärskrankheit. In den USA treten pro Jahr schätzungsweise 25.000 bis 100.000 Fälle von Legionella-Infektionen auf. Ungefähr 5-30% der an der Legionärskrankheit Leidenden sterben an der Infektion.

Das Bakterium *Legionella pneumophila* verursacht Lungenkrankheiten, vor allem Pneumonien (Lungenentzündung). Zusätzlich können andere Lungeninfektionen durch den Blutstrom oder das Lymphsystem übertragen werden, die das Herz, das Gehirn, die Niere, die Leber und/oder die Milz infizieren können. Krankheitssymptome am Anfang der Infektion sind Fieber, Schüttelfrost, Muskelschmerzen, und Appetitlosigkeit. Symptome wie Husten oder Lungenstauung kommen normalerweise nicht vor. Bei fortgeschrittener Krankheit entwickelt sich ein trockener, spitzter Husten. Die Hälfte aller Infizierten, bei denen sich die Legionärskrankheit entwickelt, leiden an Kurzatmigkeit. In vielen Fällen steigt das Fieber bis zu über 40°C (104°F).

Die verbreitetsten Methoden zur Diagnose von *Legionella pneumophila* sind Kulturen, Direkt-Fluoreszenz-Antikörper (DFA), Indirekte-Fluoreszenz-Antikörper (IFA), Enzym-Immunoassays (EIA) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Als Probenmaterial dienen hier die Atemproben von ausgehusteten Sputen, Bronchialsputungen, transtrachealen Aspiraten und Lungenbiopsien. Forschungen ergaben, dass das *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 Antigen während der Akutphase der Krankheit im Urin ausgeschieden wird und somit wurde den Antigen-Nachweis zur bevorzugten Methode in der Labordiagnostik. Der NADAL<sup>®</sup> Legionella Urin Antigen Test weist das in Urin gelöste *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 Antigen nach.

## 3. Testprinzip

Der NADAL<sup>®</sup> Legionella Urin Antigen Test nutzt zum Nachweis von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 Antigen eine Kombination von polyklonalen Antikörpern gegen *Legionella pneumophila*.

Zuerst wird Urin in die Probenöffnung der Testkassette gegeben. Diese Probe wird vom unteren Saugvlies aufgesogen und wandert dann durch die anschließende Konjugatzone, welche mobile, getrocknete gold-konjugierte Antikörper enthält, die spezifisch gegen *Legionella pneumophila* Antigene gerichtet sind. Wenn in der Urinprobe Legionella Antigene vorkommen, bildet sich ein „Halb-Sandwich“-Immunkomplex aus den Antikörpern und den Antigenen.

Dieser Immunkomplex migriert dann durch die Kapillarkräfte entlang einer Nitrozellulosemembran zur Testregion S, an der Antikörper gegen *Legionella pneumophila* Antigene aufgetragen sind. Diese Antikörper binden die „Halb-Sandwich“-Immunkomplex an sich und bilden somit einen „Voll-Sandwich“-Immunkomplex. Durch dieses gebundene „Voll-Sandwich“ erscheint eine sichtbare pinkle Linie in der Testregion S.

Wenn in der Urinprobe kein Legionella Antigen vorhanden ist, bildet sich kein „Sandwich“-Immunkomplex und es wird ein negatives Ergebnis angezeigt, da sich keine Immunkomplexe an der Testregion binden.

Um die Verlaufskontrolle des Tests zu gewährleisten, erscheint immer eine pinkfarbene Kontrolllinie in der Kontrollregion C, ungeachtet der Prä- oder Abwesenheit von Legionella Antigenen in der Urinprobe.

## 4. Bestandteile der Testpackung

10 NADAL<sup>®</sup> Legionella Urin Antigen Testkassetten inkl. Einwegpipetten (Membran ist mit einer Kombination aus polyklonalen Antikörpern gegen die Antigene von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 beschichtet)

- 1 Testanleitung

## 5. Zusätzlich benötigte Materialien

- 1 Stoppuhr
- Probensammelbehälter

## 6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Der NADAL<sup>®</sup> Legionella Urin Antigen Test muss im verschlossenen Beutel bei Raumtemperatur (15°-30°C) aufbewahrt werden. Das Testkit nicht einfrieren!

## 7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für *in vitro* Diagnostik.
- Nur die Pipette aus dem Testkit verwenden.
- Für jede Probe oder Kontrolle eine neue Pipette verwenden.
- Die Testkassette sollte bis zur Verwendung in der Verpackung aufbewahrt werden.
- Alle Proben sollten als potentiell gefährlich angesehen werden, und wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Tragen Sie Einweghandschuhe, während Sie mit den Proben hantieren und waschen Sie Ihre Hände nach der Probennahme. Achtung: Der Testanwender sollte sich auf die relevanten Kapitel aus dem CDC-NIH

Handbuch „Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories“ Fünfte Auflage, 2007 beziehen.

- Vermeiden Sie jedweden Augenkontakt.
- Die Testkassette und alle zugehörigen Testmaterialien müssen nach der Verwendung nach den lokal geltenden Vorschriften entsorgt werden.
- Verwenden Sie keine Tests nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Benutzen Sie kein Testkit zwei Mal.

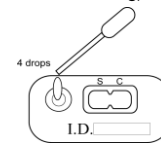
## 8. Probennahme, -Vorbereitung und Lagerung

Die Urinprobe muss in einem sauberen, sterilen Behälter gesammelt werden. Sollte der Test nicht sofort durchgeführt werden, kann die Urinprobe im Kühlschrank gekühlt bei 2°-8°C bis zu 72 Stunden aufbewahrt werden. Bei -20°C gefrorenen Proben können bis zu 2 Jahre aufbewahrt werden. Bringen Sie alle Proben vor dem Testvorgang auf Raumtemperatur (15°-30°C).

## 9. Testdurchführung

Bringen Sie die Proben und Kontrollen vor der Testung auf Raumtemperatur (15°-30°C). Nehmen Sie die Testkassette aus der Verpackung und legen Sie sie auf eine ebene Oberfläche. Kennzeichnen Sie die Kassette mit der Patientennummer.

1. Geben Sie **4 Tropfen** (ca. 0,15 ml) der Probe in die runde Probenöffnung (siehe untere Abbildung). Warten Sie bis farbige Linien erscheinen.



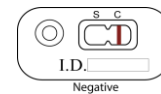
2. Lesen Sie nach spätestens **15 Minuten** das Ergebnis ab. Je nach Konzentration in der Probe kann schon vorher eine Testlinie (bei S) erscheinen. Das Erscheinen der Kontrolllinie (bei C) weist nicht darauf hin, dass die Testung beendet ist. Auswertungen nach 15 Minuten können fehlerhaft sein.



## 10. Testauswertung

### Negatives Ergebnis

Der Test ist negativ, wenn nur eine Kontrolllinie in der Kontrollregion C erscheint.



### Positives Ergebnis

Der Test ist positiv, wenn eine farbige Testlinie in der Testregion S und eine Kontrolllinie in der Kontrollregion C sichtbar wird.

Jede farbige Testlinie in der Testregion S sollte als positiv angesehen werden. Die Intensivität der Linienfarbe kann bei jeder Einzelnen von hell bis dunkel variieren. Proben mit einem Legionella Antigenlevel nahe der Nachweisgrenze des Testes können undeutliche Testlinien bilden - auch noch nach 15 Minuten; jedoch sollten Ergebnisse, die nach 15 Minuten erscheinen, nicht mehr ausgewertet werden.



### Ungültiges Ergebnis

Wenn in der Kontrollregion C keine Linie erscheint, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden. Testlinien, die in der Testregion S nach 15 Minuten erscheinen, sollten nicht mehr ausgewertet werden.

## 11. Qualitätskontrolle

### Interne Kontrollen

Das Erscheinen einer Kontrolllinie in der Kontrollregion C ist eine interne (positive) Verfahrenskontrolle. Wenn eine farbige Kontrolllinie in der Kontrollregion C der Membran erscheint, kann die Prozessstechnik, der Probenablauf und auch die Testdurchführung als korrekt angesehen werden. Falls keine Kontrolllinie in der Kontrollregion C sichtbar wird, ist das Testergebnis ungültig.

Ein farbiger Hintergrund ist eine interne (negative) Verfahrenskontrolle. Die Hintergrundfarbe der Testkassette sollte weiß bis zu leicht pink sein und das Ablesen des Testresultates nicht behindern. Falls ein Ergebnis schwer interpretierbar ist, sollte die Testung mit derselben Probe wiederholt werden, um mögliche Störungen zu vermeiden.

Führen Sie eine neue Testung durch, wenn die ursprüngliche Probe immer wieder unlesbare Resultate erbringt. Es wird empfohlen, die internen Qualitätskontrollen bei jeder Testdurchführung aufzuzeichnen.

### Externe Kontrollen

Qualitätskontrollen sollten bei jedem neu geöffneten Testkit durchgeführt werden. Eine zusätzliche Untersuchung mit passenden Kontrollen auf *Legionella pneumophila* muss in Übereinstimmung mit federalen, gesetzlichen und/oder lokalen Regelungen, genehmigten Vorgaben und Laborqualitätskontrollabläufen gemacht werden. Die externen Positiv- und Negativkontrollen gehören nicht zum Lieferumfang und sind auf Anfrage erhältlich.

## 12. Grenzen des Tests

- Ein negatives Ergebnis des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests schließt eine mögliche Infektion mit *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 nicht aus. Die Antigen-Konzentration könnte unter der Nachweisgrenze des Testes liegen. Das Anlegen einer Kultur ist empfehlenswert für Patienten mit Pneumonie-Verdacht, um festzustellen ob andere Erreger als *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 für die Infektion verantwortlich sind.
- Der NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test erbringt nur eine vorläufige Diagnose; und zwar nur für *Legionella pneumophila* Serogruppe 1. Um eine exakte Diagnose zu erhalten, sollten Kulturbefunde, Serologietestungen und Testmethoden auf Antigenbasis in Verbindung mit klinischen Erkenntnissen angewendet werden.
- Sensitive Immunoassays können positive Ergebnisse von Proben, die heterophile Antikörper enthalten, ergeben. Falls die qualitative Interpretation des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests nicht mit klinischen Befunden vereinbar ist, sollten weitere Untersuchungen mit alternativen Methoden gemacht werden.
- Die Ausscheidung des Legionella Antigens beginnt normalerweise schon 3 Tage vor dem Ausbruch der entsprechenden Krankheitssymptome. Jedoch kann das Antigen auch noch bis zu ein Jahr danach weiterhin ausgeschieden werden. Ein positives Ergebnis mit dem NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test kann deshalb sowohl während einer akuten Infektion, als auch im Rahmen einer schon abgeschlossenen Infektion getestet werden. Um eine gesicherte Diagnose zu erhalten, sollten deshalb immer Kulturbefunde, Serologietestungen und Testmethoden auf Antigenbasis in Verbindung mit klinischen Erkenntnissen genutzt werden.

## 13. Leistungsmerkmale des Tests

### Klinische Sensitivität und Spezifität (Retrospektive Studie)

An drei klinischen Standorten (USA und Niederlande) wurden dreihundertvierundzwanzig (324) gefrorene Proben mit dem NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test getestet. Die Proben wurden vorher auf Legionella durch eine Zellkultur untersucht. Die Werte werden unten angezeigt:

		Zellkultur		
		+	-	
NADAL <sup>®</sup> Legionella	+	95	11	106
Urine Antigen Test	-	10	208	218
		105	219	324
Sensitivität: $95/105 \times 100 = 90,5\%$ (95% CI: 83,4-94,8)				
Spezifität: $208/219 \times 100 = 95,0\%$ (95% CI: 91,2-97,5)				

### Analytische Spezifität

Es wurden neunundvierzig (49) frische Patientenerine von gesunden Individuen gesammelt und an einem (1) klinischen Standort überprüft. Der NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test war in 100% der Fälle negativ.

### Kreuzreaktivitäten mit anderen Atemwegserkrankungen

Mit dem NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test wurden neunundneunzig (99) Urinproben von Patienten untersucht, die an anderen Atemwegserkrankungen erkrankt waren (84 per Kultur bestätigt, 15 nicht betätigte), untersucht. Die Ergebnisse waren in 98 von 99 Proben negativ und zeigen so einen Mangel an Reaktivität (99,0%).

### Bakterielle Kreuzreaktivität und Interferenzen

Um die analytische Spezifität des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests festzustellen, wurde mit Bakterienkulturen ( $1 \times 10^8$  cfu/ml), die vorwiegend in den Atemwegen vorkommen getestet. Alle ergaben beim NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test die erwarteten negativen Resultate. Um mögliche Interferenzen der Ergebnisse des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests durch andere Bakterien festzustellen, wurde gereinigtes Legionella Antigen zu Bakterienkulturen gegeben. Die Konzentration des Legionella Antigens lag bei  $1 \times 10^5$  cfu/ml. Alle ergaben beim NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test die erwarteten positiven Resultate.

<i>Legionella pneumophila</i> SG2	<i>Legionella gormanii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG3	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG4	<i>Legionella feeleii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG6	STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
----------------------------	------------------------------	-------------------------------

### Kreuzreaktivität durch gängige Inhaltsstoffe und Medikamente im Urin

Um mögliche Kreuzreaktivitäten oder andersartige Interferenzen auf den NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test festzustellen, wurden folgende im Urin vorkommenden Inhaltsstoffe bzw. Medikamente getestet. Gereinigtes *Legionella pneumophila* Antigen wurde mit einer Konzentration von  $4,5 \times 10^4$  cfu/mL zu den Proben hinzugefügt. Zusätzlich wurde jeder Inhaltsstoff / jedes Medikament noch ohne die Zugabe von *Legionella pneumophila* Antigen getestet. Keiner der in der Liste mit den entsprechenden Konzentrationen aufgeführten Inhaltsstoffe bzw. Medikamente beeinflusste den Test oder rief eine unverwünschte Kreuzreaktion hervor.

Glukose	2000 mg/dl	Protein - BSA	500 mg/dl
Urea	2000 mg/dl	Bilirubin	20 mg/dl
Ascorbinsäure	100 mg/dl	Rifampicin	0,09 mg/ml
Erythrozyten	$10^9$ /ml	Erythromycin	0,067 mg/ml
Leukozyten	$10^6$ /ml	Ciprofloxacin	0,22 mg/ml

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests liegt bei  $5 \times 10^4$ . *Legionella pneumophila* serogroup 1 ATCC 323152 wurde unter Verwendung von BCYE Agar gezüchtet. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, mit der getestet wurde. Die Nachweisgrenze des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests wurde anhand dieser Konzentrationen ermittelt. Der Test wurde mit 2 Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nach 15 Minuten festgestellt und dokumentiert.

### Reproduzierbarkeitsstudie

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests wurde an drei verschiedenen klinischen Laborstandorten überprüft. Der NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test wurde mit einem Panel von sechs (6) Proben getestet, von denen vier (4) mit verschiedenen Konzentrationen positiv waren und zwei (2) negativ. Die niedrig und hoch konzentrierten Positivproben wurden durch aufgereinigtes *Legionella* Antigen gewonnen. Die Negativproben waren reguläre geprüfte Urinproben bzw. Proben mit *Legionella* Antigen unterhalb der Nachweisgrenze. Drei (3) unterschiedliche Laborteams führten mit jeder der sechs Probenarten in jedem Labor über 3 Tage die Untersuchungen durch. Die gesamte Reproduzierbarkeit des NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Tests betrug 100%.

### 14. Referenzen

- Edelstein, P.H. and R. D. Meyer. "Legionella Pneumonias." In Respiratory infections: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New York: Raven Press, Ltd. 1994
- Marston, B.J., H.B. Lipman, R.F. Breiman. Surveillance for legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch.Intern. Med 1994;154:2417:2422
- Horwitz, M.A., B.J. Martson, C.V. Broome, and R.F. Freiman. Prospects for vaccine development. Presented at the 4th International Symposium on Legionella, 1992. In: Barbaree, J. M., R.F. Breiman, and A.P. DuFour, eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology, 1993.
- Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr. and L.J. Wheat. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:605-607.
- Lindsay, D.S.J., W.H. Abraham, P. Christie, F. Johnston and G.F.S. Edwards. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J. Med. Microbiol. 2004; 53:183-187.
- Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D.R. Hillyard. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Microbiol. 38; 2000; 1709-1712.
- Kohler, R.B., Winn, W.C., Wheat, L.J. Onset of the duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 601-605.
- Jonas, Daniel, A. Rosenbaum, S. Weyrick and S. Bhakdi. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA and Legionellae in Bronchoalveolar fluid. J. Clin. Microbiol. 33; 1995; 1247-1252.

Rev.: 2010-02-14 SW; 2010-06-04 SW

## 1. Intended Use

The NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test is a visually read, *in vitro* immunochromatographic rapid assay for the presumptive qualitative detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigens in human urine. This test is intended to aid in the presumptive diagnosis of Legionnaires' disease in conjunction with culture and other methods for patients with signs and symptoms of pneumonia. This rapid test is for professional use only.

## 2. Introduction and Clinical Significances

*Legionella pneumophila* serogroup 1 is gram-negative bacillus that appears off-white in color and circular in shape. This bacterium is associated with Pontiac fever and Legionnaires' disease. An estimated 25,000 to 100,000 cases involving *Legionella pneumophila* infections occur in the United States annually. About 5% to 30% of people with Legionnaires' disease die.

Infections caused by this bacterium include the pulmonary disease of pneumonia. In addition, extra pulmonary infections may be spread through the bloodstream or the lymph system, infecting the heart, brain, kidney, liver, and/or spleen. Early onset symptoms include fever, chills, muscle aches, and lack of appetite. Respiratory symptoms such as coughing or congestion are usually absent. As the disease progresses, a dry, hacking cough develops and may become productive after a few days. Half of people who develop Legionnaires' disease suffer shortness of breath. In many cases, a fever as high as 40°C (104°F) has been reported.

Common methods for the detection of *Legionella pneumophila* are culture, direct fluorescent antibody (DFA), indirect fluorescent antibody (IFA), enzyme immunoassays (EIA) and polymerase chain reaction (PCR) using respiratory specimens of expectorated sputum, bronchial washing, transtracheal aspirate and lung biopsy. *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen has been detected in urine during the acute phase of the disease and has become the method by choice for laboratory diagnosis. The NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test is designed for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 soluble antigen in a urine sample.

## 3. Principle of the Test

The NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test utilises a combination of polyclonal antibodies against the antigens of *Legionella pneumophila*.

The NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test begins with the addition of urine to the test device. The specimen is absorbed by the sample pad and then moves through the conjugate pad which contains dried gold conjugated antibodies which are specific for *Legionella pneumophila* antigens; if the Legionella antigens are present in the urine sample, a "half-sandwich" immunocomplex is formed. This immuno-complex then migrates via capillary action along a nitrocellulose membrane containing immobilised antibodies to *Legionella pneumophila* antigens. The immobilised antibodies bind the "half-sandwich" immuno-complex to form a "whole sandwich" immuno-complex. Thus, when the "whole sandwich" is formed, a visible, pink coloured line develops in the specimen zone on the test device. In the absence of a Legionella antigen, a "sandwich" immuno-complex is not formed and a negative result is indicated. To serve as a procedural control, a pink coloured control line will always appear in the control zone regardless of the presence or absence of Legionella antigen. The test is available in cassette format.

## 4. Reagents and Materials Supplied

- 10 NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test Devices incl. disposable specimen dropper  
(A membrane coated with a combination of polyclonal antibodies against the antigens of *Legionella pneumophila* serogroup 1)
- 1 User Manual

## 5. Additional Required Materials

- 1 Timer
- Specimen collection containers

## 6. Storage & Stability

NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test devices should be kept at room temperature (15°-30°C) in sealed pouches with a desiccant. Do not freeze the test kit.

## 7. Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Use pipette provided with kit only.
- Use separate pipettes for each sample or control.
- The test device should remain in the pouch until ready for use.
- All specimens should be considered potentially hazardous, and should be handled in the same manner as an infectious agent.
- Wear disposable gloves while handling samples and wash hands after the assay is complete. Warning: The user should refer to the relevant section of the CDC-NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," Fifth Edition, 2007.
- Avoid any contact with eyes.
- The test device and all materials should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Do not use kits after the stated expiration date.
- Do not reuse test devices or kit materials.

## 8. Specimen Collection and Preparation

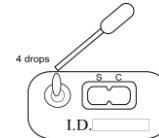
The urine specimen must be collected in a clean, sterile container. Urine specimens may be refrigerated (2°-8°C) and stored up to 72 hours prior to assay. Specimens may be stored frozen for up to 2 years. If specimens are refrigerated, they must be equilibrated to room temperature before testing.

## 9. Procedure of the Test

Allow specimen and/or controls to reach room temperature (15° – 30°C) prior to testing.

Remove test device from pouch and lay on a flat surface. Label the device with the patient ID.

1. Dispense **4 drops** (approximately 0.15 ml) of specimen into the round sample well (see illustration below). Wait for coloured lines to appear.



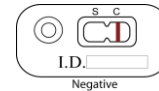
2. Read results at **15 minutes** or less. The presence of the control line is not indicative of the test being completed. Interpretation after 15 minutes may be inaccurate.



## 10. Interpretation of the Results

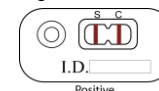
### Negative Results

The test is negative if a coloured line appears in the C area (control) only.



### Positive Results

The test is positive if one coloured line appears in the S (specimen) area and one coloured line appears in the C (control) area. Any coloured line in the specimen area should be considered positive. Coloured lines may appear lighter or darker than one another. Specimens with Legionella antigen levels near the threshold of the test may develop colour (faint lines) overtime after the 15 minute reading; however, a line that appears after 15 minutes is invalid and should be ignored.



### Invalid Results

The test is invalid if no coloured line appears in the C (control) area even if a coloured line appears in the S (specimen) area. If a coloured line does not appear in the C area, the test is invalid and should be repeated. Coloured lines that appear in the S (specimen) area after 15 minutes are invalid and should be ignored.

## 11. Quality Control

### Internal Controls

The appearance of a control line in the C region of the device is a positive procedural control. Correct procedural technique, specimen flow and device performance is confirmed when a coloured line appears in the C (control) area of the membrane. If the colored line fails to appear in the C (control) area, the test result is invalid.

A clear background is an internal negative procedural control. The background colour should be white to light pink and should not interfere with the reading of the test result. If any result is difficult to interpret, the test should be repeated with the same sample to eliminate the potential for error. Obtain a new sample and retest when the original sample repeatedly produces unreadable results. It is recommended that the internal quality controls be recorded for each sample run.

### External Controls

Quality control should be performed on each new test kit opened. Additional testing of the appropriate controls of *Legionella pneumophila* may be performed in accordance with federal, state and/or local regulations, accrediting requirements, and your laboratory's quality control procedures. Positive and negative external controls are supplied separately.

## 12. Limitations

- A negative antigen result does not rule out the possible infection from *Legionella pneumophila* serogroup 1. The antigen concentration may fall below the detectable limit of the test. Culture is recommended for patients with suspected pneumonia to determine if other causative agents other than *Legionella pneumophila* serogroup 1 are responsible.
- The test provides a presumptive diagnosis for only *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection. In order to make an accurate diagnosis, culture results, serology testing and antigen detection methods in conjunction with clinical findings should be used.
- Sensitive immunoassays may demonstrate positive results with specimens containing heterophilic antibodies. If the qualitative interpretation is inconsistent with clinical findings, then further testing by an alternate method should be performed.

- Excretion of Legionella antigen may be seen as early as three (3) days after the onset of symptoms. However, antigen may continue to be excreted up to one (1) year afterwards. A positive result with the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test may occur during a current and past infection; therefore, in order to make an accurate diagnosis, culture results, serology testing and antigen detection methods in conjunction with clinical findings should be used.

### 13. Performance Characteristics

#### Clinical Sensitivity and Specificity (Retrospective Study)

Three clinical sites (USA and Netherlands) tested three hundred twenty four (324) frozen specimens using the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test. These samples were previously tested for Legionella by cell culture. Results are reported below.

		Cell Culture		
		+	-	
NADAL <sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test	+	95	11	106
	-	10	208	218
		105	219	324
Sensitivity: 95/105 x 100 =		90.5 % (95% CI: 83.4-94.8)		
Specificity: 208/219 x 100 =		95.0 % (95% CI: 91.2-97.5)		

#### Analytical Specificity

Forty-Nine (49) fresh patient urines from healthy individuals were collected and assayed at one (1) clinical site. One hundred percent (100%) of these were found to be negative by the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test.

#### Cross-Reactivity with other Respiratory Tract Infections

Ninety-nine (99) urine samples from patients diagnosed for other etiological respiratory tract infections (84 culture confirmed, 15 suspected) were tested using the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test. The results showed a lack of reactivity in 98/99 samples (99.0%).

#### Bacterial Cross-Reactivity and Interference

To confirm the analytical specificity of the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test, bacterial cultures likely to be found in the respiratory tract were tested. Bacterial cultures were tested at  $1 \times 10^5$  cfu/ml. All yielded negative results.

To confirm a lack of interference by other bacterial species in the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test, purified Legionella antigen was added to bacterial cultures likely to be found in the respiratory tract. The concentration of Legionella antigen was  $1 \times 10^5$  cfu/ml. All tests yielded positive results.

<i>Legionella pneumophila</i> SG2	<i>Legionella gormanii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG3	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG4	<i>Legionella feeleii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG6	STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

#### Common Urine Components and Drugs

The components and drugs listed below were tested to determine if they interfered or cross-reacted with NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test. Extracted *Legionella pneumophila* antigen was added at a concentration of  $4.5 \times 10^4$  cfu/mL. In addition, each compound was tested in the absence of *Legionella pneumophila* antigen. None listed interfered or cross-reacted with the test results.

Glucose	2000mg/dL	Protein - BSA	500mg/dL
Urea	2000mg/dL	Bilirubin	20mg/dL
Ascorbic Acid	100mg/dL	Rifampicin	0.09mg/mL
Erythrocytes	$10^9$ /mL	Erythromycin	0.067mg/mL
Leukocytes	$10^9$ /mL	Ciprofloxacin	0.22mg/mL

#### Limit of Detection

The limit of detection of the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test was determined to be  $5 \times 10^4$ . *Legionella pneumophila* serogroup 1 ATCC 323152 was prepared using BCYE agar. A dilution of the working concentration was performed. The limit of detection of the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test was determined from these concentrations. The test was performed in 2 replicates. Results were recorded at 15 minutes.

#### Reproducibility Study

The reproducibility of the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test was evaluated at three clinical laboratory sites. The NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test was tested against a panel of six (6) specimens of which included four levels of positives and two negatives. The low and high positives were from the purified Legionella antigen. Negatives were comprised of either urine or Legionella antigen below the detectable limit. Three (3) different laboratory personnel assayed each specimen at each laboratory facility over 3 days. The overall reproducibility for the NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antigen Test was 100%.

#### 14. References

- Edelstein, P.H. and R. D. Meyer. "Legionella Pneumonias." In Respiratory infections: Diagnosis and Management, 3<sup>rd</sup> Edition, James E. Pennington, editor. New York: Raven Press, Ltd. 1994
- Marston, B.J., H.B. Lipman, R.F. Breiman. Surveillance for legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch.Intern. Med 1994;154:2417:2422
- Horwitz, M.A., B.J. Martson, C.V. Broome, and R.F. Freiman. Prospects for vaccine development. Presented at the 4<sup>th</sup> International Symposium on Legionella, 1992. In: Barbaree, J. M., R.F. Breiman, and A.P. DuFour, eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology, 1993.
- Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr. and L.J. Wheat. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:605-607.
- Lindsay, D.S.J., W.H. Abraham, P. Christie, F. Johnston and G.F.S. Edwards. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J. Med. Microbiol. 2004; 53:183-187.
- Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D.R. Hillyard. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Microbiol. 38; 2000; 1709-1712.
- Kohler, R.B., Winn, W.C., Wheat, L.J. Onset of the duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 601-605.
- Jonas, Daniel, A. Rosenbaum, S. Weyrick and S. Bhakdi. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA and Legionellae in Bronchoalveolar fluid. J. Clin. Microbiol. 33; 1995; 1247-1252.

Rev.: 2010-03-09 KP

## 1. Domaine d'application

Le Test NADAL<sup>®</sup> Legionella antigène urinaire de nal von minden est un test rapide *in vitro* par immuno-chromatographie pour la détection qualitative de l'antigène de la *legionella pneumophila* de sérotype 1 dans l'urine humaine. Le test aide au diagnostic préliminaire de la légionellose chez des patients avec des symptômes de pneumonie dus à l'antigène de la *l.pneumophila*, en association avec la culture et d'autres méthodes.

## 2. Introduction et signification clinique

La *legionella pneumophila* de sérotype 1 est une bactérie aérobie à Gram négatif de la forme d'un bâtonnet. La *legionella pneumophila* est le déclencheur de la fièvre de Pontiac et de la légionellose.

La bactérie *legionella pneumophila* cause des maladies pulmonaires, surtout des pneumonies. En outre, d'autres infections pulmonaires peuvent se propager par le flux sanguin ou le système lymphatique pouvant contaminer le cœur, le cerveau, les reins, le foie et/ou la rate. Les symptômes de la maladie au début de l'infection sont la fièvre, les frissons, les douleurs musculaires et le manque d'appétit. Normalement, les symptômes comme la toux ou la congestion pulmonaire ne surviennent pas. Lors d'un stade avancé de la maladie, une forte toux sèche se développe. La moitié des personnes chez qui la légionellose s'est développée souffre de dyspnée. Dans beaucoup de cas<sup>1</sup>, on a pu mesurer une fièvre dépassant les 40°C (104°F).

Les méthodes de diagnostic les plus répandues pour la *legionella pneumophila* sont les cultures, l'immunofluorescence directe (IFD), l'immunofluorescence indirecte (IFI)<sup>5</sup>, l'immunodosage enzymatique (IDE)<sup>5</sup> et la réaction en chaîne par polymérase (PCR)<sup>6</sup> et utilisent des échantillons d'haleine contenant des expectorations, des lavages des bronches, des aspirations transtrachéales et des biopsies pulmonaires. Des études ont montré que l'antigène de *legionella pneumophila* de sérotype 1 est éliminé dans l'urine lors de la phase aiguë de la maladie et ainsi la détection de l'antigène est devenue la méthode de préférence dans le diagnostic de laboratoire<sup>4,5</sup>. Le test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella – antigène détecte l'antigène de la *legionella pneumophila* de sérotype 1 dissous dans l'urine.

## 3. Principe du Test

Le test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène utilise pour la détection de l'antigène de la *legionella pneumophila* de sérotype 1 une combinaison d'anticorps polyclonaux dirigés vers la *legionella pneumophila*. En premier lieu, de l'urine est déposée dans le puits de la cassette.

Cet échantillon est absorbé par le tissu inférieur et migre jusqu'à la prochaine zone de conjugué laquelle contient des anticorps mobiles et secs conjugués à de l'or et dirigés spécialement vers les antigènes de la *legionella pneumophila*. Si des antigènes de légionelle sont présents dans l'échantillon d'urine, un immuno-complexe en « demi-sandwich » se forme avec les anticorps et les antigènes.

Cet immuno-complexe migre ensuite par capillarité le long d'une membrane de nitrocellulose vers la zone de test S laquelle est recouverte d'anticorps immobiles dirigés vers les antigènes de la *legionella pneumophila*. Les anticorps immobiles se lient à l'immuno-complexe en "demi-sandwich" et forment ainsi un immuno-complexe en « sandwich entier ». Ce « sandwich entier » formé est responsable de l'apparition d'une ligne rose dans la zone de test S.

Lorsqu'aucun antigène de légionelle n'est présent dans l'échantillon d'urine, il ne se forme pas d'immuno-complexe en "sandwich" et un résultat négatif est affiché puisqu'aucun immuno-complexe ne se lie dans la zone de test. Pour garantir le contrôle du bon déroulement du test, une ligne de contrôle rose apparaît toujours dans la zone de contrôle C, indépendamment de la présence ou de l'absence de l'antigène de la légionelle dans l'échantillon d'urine.

## 4. Composants de l'emballage

- 10 tests urinaires NADAL<sup>®</sup> Legionella – antigène avec pipettes à usage unique (La membrane est recouverte d'une combinaison d'anticorps polyclonaux dirigés vers les antigènes de la *legionella pneumophila* de sérotype 1)
- 1 notice d'utilisation

## 5. Matériel supplémentaire nécessaire

- 1 chronomètre
- Collecteur d'échantillon

## 6. Péréemption et conservation des réactifs

Le test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène doit être conservé à température ambiante (15°-30°C) dans son emballage fermé. Ne pas congeler le kit de test !

## 7. Précautions et mesures de sécurité

- Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.
- N'utiliser que la pipette issue de ce kit.
- Utiliser une nouvelle pipette pour chaque échantillon et chaque contrôle.
- La cassette doit être conservée dans son emballage jusqu'à utilisation.
- Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement dangereux et traités comme potentiellement infectieux.

- Porter des gants à usage unique lors de la manipulation d'échantillons, laver ses mains après chaque recueil d'échantillon. Attention : l'utilisateur doit se référer aux chapitres importants du manuel CDC-NIH
- « Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories » cinquième édition, 2007.
- Éviter tout contact avec les yeux.
- La cassette et tous les accessoires du test doivent être éliminés après utilisation selon les directives locales.
- Ne pas utiliser de test dont la date de péremption a expiré.
- Ne pas réutiliser le kit.

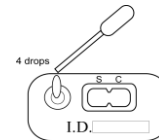
## 8. Collecte des échantillons et conservation

L'échantillon d'urine doit être recueilli dans un récipient stérile, propre et sec. Si le test n'est pas utilisé immédiatement, l'échantillon d'urine peut être réfrigéré à 2°-8°C et conservé jusqu'à 72 heures. Les échantillons congelés à -20°C peuvent être conservés jusqu'à 2 ans. Avant de débiter le test, amener tous les échantillons à température ambiante (15°-30°C).

## 9. Exécution du test

Avant de débiter le test, amener les échantillons et les contrôles à température ambiante (15°-30°C). Sortir la cassette de son emballage et la poser sur une surface plane. Indiquer le numéro du patient sur la cassette.

1. Introduire **4 gouttes** (environ 0,15 ml) de l'échantillon dans le puits (voir illustration). Attendre jusqu'à l'apparition des lignes de couleur.



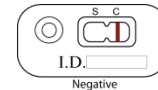
2. Lire le résultat au plus tard **15 minutes** après. En fonction de la concentration dans l'échantillon, une ligne de test (S) peut apparaître. L'apparition de la ligne de contrôle (C) n'indique pas la fin du test. Les résultats interprétés après 15 minutes peuvent être erronés.



## 10. Interprétation des résultats

### Résultat négatif

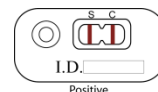
Le test est négatif lorsque seule la ligne de la zone de contrôle C apparaît.



### Résultat positif

Le test est positif lorsqu'une ligne de test colorée apparaît dans la zone de test S et une ligne de contrôle est visible dans la zone de contrôle C.

Toute ligne colorée dans la zone de test S doit être considérée comme résultat positif. L'intensité de la couleur peut varier de clair à foncé pour chacune des lignes. Les échantillons avec un taux d'antigènes de légionelle proche du seuil de détection du test peuvent former des lignes peu lisibles, même après 15 minutes ; cependant, il ne faut plus interpréter les résultats qui apparaissent après 15 minutes.



### Résultat non-valide

Le test est non-valide si aucune ligne colorée n'apparaît dans la zone de contrôle C ni dans la zone de test S.

Si aucune ligne n'apparaît dans la zone de contrôle C, le test est non-valide et doit être recommencé. Les lignes de test qui apparaissent après 15 minutes dans la zone de test S ne doivent plus être interprétées.

## 11. Contrôle Qualité

### Contrôles internes

L'apparition d'une ligne de contrôle dans la zone de contrôle C est un contrôle interne (positif) du déroulement du test. Si une ligne de contrôle colorée apparaît dans la zone de contrôle C de la membrane, on peut dire que le procédé, la migration de l'échantillon et l'exécution du test sont corrects. Si aucune ligne n'est visible dans la zone de contrôle C, le résultat de test est non-valide. Un fond incolore sert de contrôle interne (négatif) de déroulement du test. Le fond de la cassette doit être blanc à légèrement rose et ne doit pas empêcher la lecture du résultat du test. Si un résultat est difficile à interpréter, il faut recommencer le test avec le même échantillon pour éviter toute perturbation. Recommencer le test si l'échantillon d'origine donne toujours des résultats illisibles. Il est recommandé de noter les contrôles de qualité lors de chaque test.

### Contrôles externes

Les contrôles de qualité doivent être réalisés à chaque ouverture de kit de test. Une analyse supplémentaire doit être faite avec les contrôles adéquats pour rechercher la *legionella pneumophila* en accord avec les réglementations régionales, légales et/ou locales, les directives approuvées et les méthodes de contrôle de qualité en laboratoire. Les contrôles positifs et négatifs externes ne sont pas fournis dans le kit et sont disponibles sur

demande. Fédéraux, légaux et/ou locaux et les contrôles de qualités réglementaires de laboratoire. Les contrôles externes positif et négatif ne sont pas livrés avec le coffret de test et peuvent être obtenus sur demande.

## 12. Limites du Test

- Un résultat négatif du test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène n'exclut pas une éventuelle infection à la legionella pneumophila de sérotype 1. La concentration de l'antigène pourrait être inférieure au seuil de détection du test. La mise en culture est recommandée pour les patients soupçonnés d'avoir une pneumonie afin de déterminer si d'autres agents pathogènes que la legionella pneumophila de sérotype 1 sont responsables de l'infection.
- Le test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène ne fournit qu'un préliminaire; et ce uniquement pour la legionella pneumophila de sérotype 1. Pour obtenir un diagnostic exact, il faut employer des résultats de cultures, des tests sérologiques et des méthodes d'analyse à base d'antigènes en association avec les connaissances cliniques.
- Les immunodosages sensibles peuvent donner des résultats positifs pour des échantillons contenant des anticorps hétérophiles. Si l'interprétation qualitative du test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène n'est pas compatible avec des connaissances cliniques, il faut alors faire d'autres analyses avec des méthodes alternatives.
- L'élimination de l'antigène de la légionelle commence normalement dès 3 jours avant l'apparition des symptômes de la maladie. Cependant, l'antigène peut encore être éliminé même un an après. Un résultat positif avec le test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène peut alors apparaître lors de l'infection aiguë mais aussi une fois l'infection passée. Pour obtenir un diagnostic sûr, il faudrait alors toujours employer des résultats de cultures, des tests sérologiques et des méthodes d'analyse à base d'antigènes en association avec les connaissances cliniques.

## 13. Caractéristiques et performances

### Sensibilité et spécificité clinique (étude rétrospective)

324 échantillons congelés ont été testés avec le test NADAL<sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire) sur 3 sites cliniques différents (USA et Pays-Bas). Les échantillons ont été préalablement analysés par culture cellulaire. Les valeurs sont présentées ci-dessous:

		Culture cellulaire		
		+	-	
NADAL <sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire)	+	95	11	106
	-	10	208	218
		105	219	324
Sensibilité: 95/105 x 100 =		90,5% (95% CI: 83,4-94,8)		
Spécificité: 208/219 x 100 =		95,0% (95% CI: 91,2-97,5)		

### Spécificité analytique

49 échantillons d'urine fraîchement collectés de patients sains ont été testés sur un site clinique (1). Le test NADAL<sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire) a déclaré 100% des cas comme négatif.

### Réactions croisées avec d'autres maladies respiratoires

99 échantillons urinaires de patients ont été testés avec le test NADAL<sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire). Ces patients présentaient des cas de maladies respiratoires autres que la legionellose (84 cas confirmés par culture, 15 cas non confirmés). Les résultats étaient négatifs pour 98 sur 99 des échantillons, ce qui démontre une absence de réactions croisées (99,0%).

### Réactions croisées et interférences

Afin d'identifier la sensibilité analytique du test NADAL<sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire), des cultures de bactéries surtout présentes dans les voies respiratoires ( $1 \times 10^5$  cfu/ml) sont testées. Toutes les analyses effectuées avec le test rapide NADAL<sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire) ont présenté les résultats négatifs attendus.

Afin de déterminer de possibles interférences avec les résultats des tests NADAL<sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire) avec d'autres bactéries, des antigènes purifiés de Legionella ont été ajoutés à des cultures de bactéries. La concentration des antigènes de Legionella se situe à  $1 \times 10^5$  cfu/ml. Toutes les analyses effectuées avec le test rapide NADAL<sup>®</sup> Legionella (antigène urinaire) ont présenté les résultats positifs attendus.

Legionella pneumophila SG2	Legionella gormanii	Proteus mirabilis
Legionella pneumophila SG3	Legionella longbeachae	Citrobacter freundii
Legionella pneumophila SG4	Legionella feeleii	Enterobacter cloacae
Legionella pneumophila SG5	Staphylococcus aureus	Serratia marcescens
Legionella pneumophila SG6	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas aeruginosa
Legionella bozemanii	Enterococcus faecalis	Candida albicans
Legionella micdadei	Escherichia coli	Streptococcus pneumoniae
Legionella dumoffii	Klebsiella pneumoniae	Haemophilus influenzae

## Réactions croisées avec des substances et médicaments couramment présents dans l'urine.

Afin de déterminer d'éventuelles réactions croisées ou toute autre interférence dans le test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène, les substances ou médicaments que l'on retrouve dans l'urine ont été testés. Des antigènes purifiés de la legionella pneumophila ont été ajoutés dans les échantillons avec une concentration de  $4,5 \times 10^4$  cfu/ml. En outre, chaque substance / chaque médicament a été testé sans l'ajout de l'antigène de la legionella pneumophila. Aucune des substances et aucun des médicaments de la liste données avec les concentrations correspondantes n'a influencé le test ou causé une réaction croisée non souhaitée.

Glucose	2000 mg/dl	BSA	500 mg/dl
Urée	2000 mg/dl	Bilirubine	20 mg/dl
Acide ascorb.	100 mg/dl	Rifampicine	0,09 mg/ml
Érythrocytes	$10^6$ /ml	Érythromycine	0,067 mg/ml
Leucocytes	$10^9$ /ml	Ciprofloxacine	0,22 mg/ml

### Seuil de détection du test

Le seuil de détection du test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène est de  $5 \times 10^4$ . La legionella pneumophila de sérotype 1 ATCC 323152 a été cultivée en milieu BCYE Agar. Une rangée de dilution a été réalisée et testée. Le seuil de détection du test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène a été calculé à l'aide de ces concentrations. Le test a été réalisé avec 2 réplicats. Les résultats ont été déterminés et documentés après 15 minutes.

### Étude de reproductibilité

La reproductibilité des résultats du test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène a été contrôlée sur trois sites cliniques de laboratoire différents. Le test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène a été testé avec un éventail de six (6) échantillons dont quatre (4) avec des concentrations différentes étaient positifs et deux (2) négatifs. Les échantillons positifs à concentration faible et élevée ont été produits avec des antigènes de légionelle purifiés. Les échantillons négatifs étaient des échantillons d'urine ordinaires contrôlés ou des échantillons avec l'antigène de la légionelle dans une concentration inférieure au seuil de détection du test. Trois (3) équipes de laboratoires différentes ont réalisé les analyses avec chacun des six types d'échantillons dans chaque laboratoire sur une période de 3 jours. La reproductibilité totale du test urinaire NADAL<sup>®</sup> Legionella - antigène était de 100%.

## 14. Références

- Edelstein, P.H. and R. D. Meyer. "Legionella Pneumonias." In Respiratory Infections: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New York: Raven Press, Ltd. 1994
- Marston, B.J., H.B. Lipman, R.F. Breiman. Surveillance for legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch.Intern. Med 1994;154:2417:2422
- Horwitz, M.A., B.J. Martson, C.V. Broome, and R.F. Freiman. Prospects for vaccine development. Presented at the 4th International Symposium on Legionella, 1992. In: Barbaree, J. M., R.F. Breiman, and A.P. DuFour, eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology, 1993.
- Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr. and L.J. Wheat. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:605-607.
- Lindsay, D.S.J., W.H. Abraham, P. Christie, F. Johnston and G.F.S. Edwards. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J. Med. Microbiol. 2004; 53:183-187.
- Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D.R. Hillyard. Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Micbiol. 38; 2000; 1709-1712.
- Kohler, RB, Winn, WC, Wheat, LJ. Onset of the duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 601-605.
- Jonas, Daniel, A. Rosenbaum, S. Weyrick and S. Bhakdi. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA and Legionellae in Bronchoalveolar fluid. J. Clin. Micbiol. 33; 1995; 1247-1252.

Rév. : 2010-06-04 YF



## 1. Uso Previsto

El test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina de nal von minden es un ensayo inmunocromatográfico rápido para la detección cualitativa de *Legionella pneumophila* para la detección de los antígenos del grupo 1 en orina. Su finalidad es servir de apoyo en el diagnóstico de la enfermedad de la legionela en conjunción con el cultivo y otros métodos para pacientes con signos y síntomas de pulmonía. Este test rápido es solo para uso prescriptivo.

## 2. Introducción y significado clínico

La *Legionella pneumophila* serotipo 1 son bacilos gram negativo que aparecen con forma circular en el cuerpo y de color blanco. Esta bacteria esta asociada con la fiebre de Pontiac y con la enfermedad de la legionela. Los casos estimados relacionados con la *Legionella pneumophila* en Estados Unidos son de 25,0002 a 100,0003 anualmente. Del 5% al 30 % de estos casos fallecen.

La pulmonía es otra enfermedad infecciosa causada por esta bacteria. Otras infecciones pulmonares pueden extenderse a través de la corriente sanguínea o del sistema linfático, infectando el corazón, cerebro, riñón, hígado y/o bazo. Los síntomas previos incluyen fiebre, frío, dolor muscular y falta de apetito.

Síntomas respiratorios como tos o congestión no suelen presentarse. Durante el progreso de la enfermedad se desarrollará una tos seca y picante. La mitad de las personas que contraen la enfermedad sufre deficiencia respiratoria. En muchos casos causa una fiebre alta de hasta 40°C (104° F).

Los métodos comunes para la detección de la *Legionella pneumophila* son los cultivos, anticuerpos fluorescentes directos (DFA), anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), inmunoensayos para enzimas (EIA) <sup>5</sup> y mediante las pruebas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) <sup>6</sup> usando muestras respiratorias de esputo, lavado bronquial o biopsia pulmonar.

El antígeno de la *Legionella pneumophila* serotipo 1 ha sido detectado en orina durante la fase aguda de la enfermedad. El test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina esta diseñado para la detección del antígeno del grupo 1 *Legionella pneumophila* y ha sido elegido como método de detección por el laboratorio de diagnósticos. <sup>4,5</sup>

## 3. Principios del test

El test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina utiliza una combinación de anticuerpos policlonales contra los antígenos de la *Legionella pneumophila*. Este test empieza con la utilización del dispositivo donde debe ser añadida la muestra de orina. Esta muestra es absorbida por la almohadilla de la prueba para que después sea absorbida por la almohadilla que contiene los anticuerpos de oro coloidal específicos para los antígenos de la *Legionella pneumophila*; si los antígenos de la Legionella están presentes en la muestra de orina se formará un inmunocomplejo de medio sandwich. Este inmunocomplejo migra por vía capilar a lo largo de una membrana de nitrato de celulosa que contiene anticuerpos inmovilizados de *Legionella pneumophila* antígenos.

Estos anticuerpos inmovilizados se acoplan en el inmunocomplejo de medio sandwich para formar un inmunocomplejo de sandwich entero. Cuando esta formado el sandwich entero, aparecerá una visible línea rosa en la zona de la muestra del dispositivo de actuación del test.

En caso de ausencia del antígeno de la legionela no se formará el medio sandwich inmunocomplejo y por tanto mostrara un resultado negativo. Como procedimiento de control debiera aparecer siempre una línea rosa en la zona de control en relacion a la presencia o a la ausencia del antígeno de la legionela. El test esta disponible en formato cassette.

## 4. Reactivos y material suministrado

- 10 Test NADAL<sup>®</sup> Legionella incluyendo un cuentagotas para la muestra (Una membrana revestida de una combinación de anticuerpos policlonales contra los antígenos de la *Legionella pneumophila* sero- grupo 1)
- 1 Instrucciones de uso

## 5. Otros materiales necesarios

- 1 Cronómetro
- Frascos recolectores de muestras

## 6. Almacenamiento y conservación

El test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina debe ser guardado a temperatura ambiente (15°-30°C), cerrado en una bolsa hermeticamente y acompañado de una bolsita antihumedad. No congelar el kit del test.

## 7. Advertencias y precauciones

- Solo para diagnósticos In-vitro.
- Usar solo la pipeta que se adjunta con el kit.
- Usar pipetas diferentes para cada muestra o control.
- El mecanismo del test debe estar en la bolsa hasta que vaya a ser usado.
- Todas las muestras son consideradas potencialmente contaminadas y deben ser manipuladas como si fueran agentes infecciosos.
- Utilizar guantes mientras se estén manejando las muestras y lavarse las manos cuando el ensayo haya concluido. Aviso: el usuario debe referirse al manual CDC-NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," Fifth Edition, 2007.

- Evitar cualquier contacto con los ojos.
- El mecanismo del test y todos los materiales deben ser desechados en unos contenedores apropiados tras su utilización.
- No utilizar el kit tras la fecha de caducidad.
- No reutilizar el test o los materiales del kit.

## 8. Toma de muestras y preparación

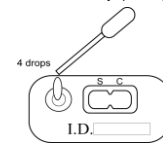
La muestra de orina debe ser recolectada en un recipiente limpio y estéril. Muestras de orina pueden ser almacenadas entre (2°-8°C) y conservarlas hasta 72 horas antes de su utilización. Las muestras pueden ser congeladas hasta 2 años. Si la muestra es congelada la muestra debe estar a temperatura ambiente antes de ser usada para el ensayo.

## 9. Procedimiento del Test

Antes de realizar el ensayo permitir que las muestras y/o los controles alcancen la temperatura ambiente (15° - 30°C).

Sacar el test de la bolsa y ponerlo sobre una superficie plana. Colocar la etiqueta con el ID del paciente.

1. Dispense 4 gotas (aproximadamente 0.15 ml) de muestra dentro del pocillo redondo (ver ilustración abajo). Esperar a que aparezca la línea de color.



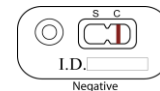
2. Leer los resultados tras 15 minutos. La presencia de la línea de control no es indicativa de que el test haya sido completado. Pasados los 15 minutos es posible que el test ofrezca resultados equivocados.



## 10. Interpretación de resultados

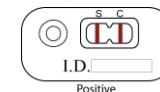
### Resultados negativos

El test es negativo si solo aparece una línea de color en la zona de control (C).



### Resultados positivos

El test es positivo si aparece una línea de color en la zona de la muestra (S) y otra en la zona de control del test (C). Si no aparece ninguna línea de color en la zona de la muestra se considerara como positivo. A veces las líneas de color aparecen mas fuertes o débiles. Muestras con el antígeno de la legionela con niveles cerca del umbral del test pueden hacer aparecer líneas mas débiles. Las líneas que aparezcan tras los 15 minutos no deben ser usadas para el diagnóstico y deberán ser ignoradas.



## 11. Control de Calidad

### Controles internos

La aparición de una línea de control en el área C del cassette es un resultado positivo en el control del procedimiento. Un correcto procedimiento técnico, que la muestra haya fluido correctamente y un correcto funcionamiento del dispositivo se confirma cuando una línea de color aparece en el área C (control) de la membrana. Si la línea de color no aparece en la zona C (control), el resultado es inválido. Un fondo claro es un control negativo de control de calidad. El fondo coloreado debe ser blanco con una línea rosa y no debe interferir en la lectura del resultado del test. Si algún resultado es difícil de interpretar, el test debe ser repetido con la misma muestra para eliminar los errores potenciales. Obtener una nueva muestra y volver a testar cuando la muestra original ya haya sido testada en varias ocasiones y haya producido resultados no interpretables. Se recomienda que los controles internos de calidad sean comprobados en cada muestra.

### Controles externos

El control de calidad debe ser realizado en un test de cada kit nuevo. Otros testados adicionales para el testado apropiado de los controles de *Legionella pneumophila* puede ser realizados de acuerdo con las regulaciones federales o locales, acreditando los requerimientos y con los procedimientos de control de su propio laboratorio. Los controles positivos y negativos externos se suministran de manera separada.

## 12. Limitaciones

- Un resultado negativo de antígenos no implica una posible infección de *Legionella pneumophila* del serotipo 1. Las concentraciones del antígeno pueden encontrarse por debajo del umbral de detección del test. Se recomienda hacer un cultivo para los pacientes en los que existan sospechas de pneumonia para determinar si otros agentes pueden ser los causantes a parte de los agentes del serogrupo 1 de *Legionella pneumophila*.
- El test prevee una diagnosis de la infección por *Legionella pneumophila* del serotipo 1. Para realizar una diagnosis precisa, se deben utilizar los resultados de los cultivos, los testados de serología y los métodos de detección de los antígenos, en conjunción con los resultados clínicos.

- Los inmunoensayos sensibles pueden mostrar resultados positivos con muestras que contengan anticuerpos heterófilos. Si la interpretación cualitativa de los resultados clínicos es inconsistente, entonces realizar otro testado con métodos alternativos.
- La excreción del antígeno de la Legionella debe ser visto antes de tres días tras la aparición de síntomas. A pesar de ello el organismo continúa excretando el antígeno de la Legionella hasta un año tras la infección. Un resultado positivo del test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina puede ocurrir durante una infección actual o pasada; por ello en base a la realización de una diagnosis precisa, se deben utilizar los resultados de los cultivos, los testados de serología y los métodos de detección de los antígenos, en conjunción con los resultados clínicos.

### 13. Características de rendimiento

#### La sensibilidad y especificidad clínica (estudio retrospectivo)

Tres items clínicos (USA y Holanda) testaron trescientos veinticuatro muestras congeladas usando test NADAL<sup>®</sup> del antígeno de la Legionella en orina. Estas muestras fueron previamente testadas por el cultivo celular de la Legionella. Los resultados se reflejan a continuación:  
NADAL<sup>®</sup> del antígeno de la Legionella en orina

NADAL <sup>®</sup> del antígeno de la Legionella en orina	Cultivo celular			
	+	-		
+	95	11	106	
-	10	208	218	
	105	219	324	

Sensibilidad:  $95/105 \times 100 = 90.5\%$  (95%CI:83.4-94.8)

Especificidad:  $208/219 \times 100 = 95.0\%$  (95%CI:91.2-97.5)

#### Especificidad analítica

49 muestras de orina fresca de pacientes sanos fueron recolectadas y testadas en un item clínico. Un 100% de éstas muestras fueron decretadas negativas por el test NADAL<sup>®</sup> del antígeno de la Legionella en orina.

#### Reacciones cruzadas con otras infecciones del tracto respiratorio

99 muestras de orina de pacientes diagnosticados con infecciones etiológicas de tracto respiratorio (84 cultivos fueron confirmados, 15 fueron sospechosos) fueron testados con el test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina. Los resultados mostraron el rango de reactividad en 98/99 muestras (99,0%).

#### Interferencias y reacciones cruzadas bacterianas

Para confirmar la especificidad analítica del test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina, se testaron cultivos bacterianos comúnmente encontrados en el tracto respiratorio. Los cultivos bacterianos fueron testados a  $1 \times 10^8$  cfu/ml. Todos ofrecieron resultados negativos.

Para confirmar la carencia de interferencias por otras especies bacterianas en el test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina, el antígeno puro de la Legionella fue añadido a los cultivos bacterianos encontrados comúnmente en el tracto respiratorio. La concentración del antígeno de Legionella era  $1 \times 10^5$  cfu/ml. Todos los test ofrecieron resultados positivos.

<i>Legionella pneumophila</i> SG2	<i>Legionella gormanii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG3	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG4	<i>Legionella feeleii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG6	STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

#### Componentes comunes de la orina y las drogas

Los componentes y drogas listados a continuación fueron testados para determinar si interfirieron o tuvieron reacciones cruzadas con el test NADAL<sup>®</sup> Legionella en orina. El extracto del antígeno de Legionella pneumophila fue añadido a la concentración de  $4.5 \times 10^4$  cfu/mL. Además cada componente fue testado en la ausencia del antígeno de la Legionella pneumophila. No se han reconocido interferencias o reacciones cruzadas con los resultados del test.

Glucosa	2000 mg/dl	Proteína- BSA	500 mg/dl
Urea	2000 mg/dl	Bilirubina	20 mg/dl
Ácido ascórbico	100 mg/dl	Rifampicin	0,09 mg/ml
Eritrociteno	106/ml	Eritromicina	0,067 mg/ml
Leucocitos	106/ml	Ciprofloxacín	0,22 mg/ml

### 14. Referencias

1. Edelstein, P.H. and R. D. Meyer. "Legionella Pneumonias." In Respiratory infections: Diagnosis and Management, 3<sup>rd</sup> Edition, James E. Pennington, editor. New York: Raven Press, Ltd. 1994
2. Marston, B.J., H.B. Lipman, R.F. Breiman. Surveillance for legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch.Intern. Med 1994;154:2417:2422
3. Horwitz, M.A., B.J. Martson, C.V. Broome, and R.F. Freiman. Prospects for vaccine development. Presented at the 4<sup>th</sup> International Symposium on Legionella, 1992. In: Barbaree, J. M., R.F. Breiman, and A.P. DuFour, eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology, 1993.
4. Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr. and L.J. Wheat. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:605-607.
5. Lindsay, D.S.J., W.H. Abraham, P. Christie, F. Johnston and G.F.S. Edwards. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J. Med. Microbiol. 2004; 53:183-187.
6. Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D.R. Hillyard. Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Micbiol. 38; 2000; 1709-1712.
7. Kohler, RB, Winn, WC, Wheat, LJ. Onset of the duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 601-605.
8. Jonas, Daniel, A. Rosenbaum, S. Weyrick and S. Bhakdi. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA and Legionellae in Bronchoalveolar fluid. J. Clin. Micbiol. 33; 1995; 1247-1252.

Rev.: 2010-02-10 MD

## 1. Uso Previsto

Il test NADAL<sup>®</sup> Legionella è un test rapido immunocromatografico in vitro per la determinazione qualitativa dell'antigene del sierogruppo 1 della *Legionella pneumophila* in campioni di urina umana. Il test, insieme alle colture e ad altri metodi è di ausilio nella diagnosi di una presunta infezione da Legionella (malattia del legionario) causata da Legionella Pneumophila del sierogruppo 1. Questo test deve essere utilizzato dietro prescrizione medica.

## 2. Introduzione

La *Legionella pneumophila* del sierogruppo 1 è un bacillo gram-negativo che appare in forma circolare e di colore bianco sporco. Questo batterio è associato alla febbre di Pontiac e alla malattia del legionario. Negli Stati Uniti si stimano dai 25.000<sup>2</sup> ai 100.000<sup>3</sup> casi all'anno di infezione di *Legionella pneumophila*. Il 5%-30% delle persone infette dalla malattia del legionario muore.

Le infezioni causate da questo batterio includono una grave forma di polmonite. Inoltre, le infezioni polmonari possono essere diffuse attraverso il sangue o il sistema linfatico, infettando il cuore, il cervello, i reni, il fegato, e/o la milza. I primi sintomi includono febbre, brividi, dolori muscolari e la mancanza di appetito. I sintomi respiratori come tosse o congestione sono generalmente assenti. Con il progredire della malattia si sviluppa una tosse secca e stizzosa che potrebbe diventare produttiva dopo pochi giorni. La metà delle persone che sviluppano la malattia del legionario soffrono di respiro affannoso (dispnea). In molti casi<sup>1</sup>, si registrano casi di febbre alta (40°C).

I metodi più utilizzati per la determinazione della *Legionella pneumophila* sono la coltura, la fluorescenza diretta dell'anticorpo (DFA), la fluorescenza indiretta dell'anticorpo (IFA)<sup>5</sup>, il saggio immunoenzimatico (EIA)<sup>5</sup> e la reazione a catena della polimerasi (PCR)<sup>6</sup> usando campioni respiratori e di espettorato (catarro), lavaggio bronchiale, aspirato transtracheale e biopsia polmonare. La rilevazione dell'antigene del sierogruppo 1 della *Legionella pneumophila* nell'urina durante la fase acuta della malattia è diventato il metodo di diagnosi più scelto dai laboratori<sup>4,5</sup>. Il test NADAL<sup>®</sup> Legionella è stato concepito per rilevare l'antigene del sierogruppo 1 della *Legionella pneumophila* nell'urina.

## 3. Principio del Test

Il test NADAL<sup>®</sup> Legionella utilizza una combinazione di anticorpi policlonali contro gli antigeni della *Legionella pneumophila*. La fase iniziale del test NADAL<sup>®</sup> Legionella prevede l'aggiunta del campione nel dispositivo. Il campione viene poi assorbito dalla membrana del campione e migra lungo di essa legandosi al coniugato orocolloidale contenente anticorpi specifici per gli antigeni della *Legionella pneumophila*; se gli antigeni della Legionella sono presenti nel campione d'urina, si forma un immunocomplesso "half-sandwich". Questo immunocomplesso migra per via capillare lungo la membrana di nitrocellulosa contenente anticorpi immobilizzati diretti contro gli antigeni di *Legionella pneumophila*. Gli anticorpi immobilizzati si legano con l'immunocomplesso "half-sandwich" formando un immunocomplesso "whole sandwich". Al formarsi dell'immunocomplesso "whole sandwich", comparirà una linea rosa nella zona del campione presente sulla cassetta. In assenza di antigeni della Legionella, non si forma alcun immunocomplesso a "sandwich" e questo genererà un risultato negativo. Indipendentemente dalla presenza o assenza dell'antigene della Legionella apparirà una linea rosa nella zona di controllo come procedura di controllo. Il test è disponibile in cassetta.

## 4. Reagenti e Materiali Forniti

- 10 Dispositivo del test incl. contagocce monouso- Una membrana rivestita di anticorpi policlonali diretti contro anticorpi del sierogruppo 1 della *Legionella pneumophila*
- 1 Istruzioni d'uso

## 5. Altri materiali necessari

- Timer
- Contenitori per la raccolta del campione

## 6. Conservazione e stabilità

Il test NADAL<sup>®</sup> Legionella deve essere conservato a temperatura ambiente (15°-30°C) nella confezione sigillata con desiccante. Non congelare il test.

## 7. Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *In-vitro*.
- Usare solo contagocce forniti con il kit.
- Usare contagocce diversi per ogni campione o controllo.
- Il dispositivo del test dovrebbe rimanere nella confezione sigillata fino al suo utilizzo.
- Tutti i campioni devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi.
- Indossare guanti protettivi durante la manipolazione di campione e lavarsi le mani dopo aver effettuato il test. Avvertenza: Attenersi al manuale CDC-NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," quinta edizione, 2007.
- Evitare il contatto con gli occhi.
- Il dispositivo del test e tutti i materiali devono essere gettati in appositi contenitori biologici.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Non riutilizzare il dispositivo del test o altri materiali del kit.

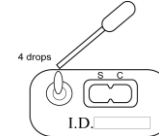
## 8. Raccolta e preparazione del campione

Il campione d'urina deve essere raccolto in un contenitore pulito e sterile. I campioni d'urina possono essere refrigerati (2°-8°C) e conservati fino a 72 ore. I campioni possono essere congelati fino a 2 anni. Se i campioni sono refrigerati, devono essere portati a temperatura ambiente prima del loro utilizzo.

## 9. Procedura del Test

Portare campioni e / controlli a temperatura ambiente (15° – 30°C) prima del test.

1. Rimuovere la cassetta dal sacchetto e appoggiarla su una superficie piana. Etichettare la cassetta con i dati del paziente.
2. Distribuire **4 gocce** (circa 0.15 ml) di campione nel pozzetto (vedi illustrazione sotto). Attendere la comparsa delle linee colorate.



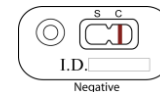
3. Leggere i risultati dopo **15 minuti**. La presenza della linea di controllo non indica l'avvenuta esecuzione del test. L'interpretazione del test oltre 15 minuti può dare risultati errati.



## 10. Interpretazione dei risultati

### Risultato negativo

Il test è negativo se appare solo la linea nella zona di controllo (C).



### Risultato positivo

Il test è positivo se appare solo una linea colorata nella zona del campione S e se non appare la linea nella zona di controllo (C). Qualsiasi linea colorata nella zona del campione deve essere interpretata come un risultato positivo. L'intensità del colore delle linee può variare. Campioni contenenti livelli antigenici di Legionella vicini alla soglia di rilevazione del test possono portare alla formazione di linee colorate debolmente se si legge il risultato oltre i 15 minuti; la comparsa della linea oltre i 15 minuti non è rilevante ai fini diagnostici e non va presa in considerazione.



### Non valido

Il test si considera non valido se non compare alcuna linea della zona di controllo (C), anche se appare una linea colorata nell'area del campione (S). Se non compare alcuna linea colorata nella zona di controllo C il test non è valido ed è necessario ripeterlo. La comparsa di linee colorate oltre i 15 minuti non è rilevante ai fini diagnostici e non va presa in considerazione.

## 11. Controllo di qualità

### Controlli interni

La comparsa di una linea di controllo nella zona C è da intendersi come controllo positivo interno della procedura. La comparsa di una linea nella zona di controllo conferma una corretta procedura, una corretta migrazione del campione e che il test è il buon funzionamento del dispositivo. Se non compare la linea nell'area di controllo C (control) il risultato del test non è valido.

Uno sfondo chiaro funge da controllo negativo interno della procedura. Il colore dello sfondo dovrebbe essere bianco o rosa chiaro e non dovrebbe interferire con la lettura del risultato. Se si ha difficoltà nell'interpretazione del risultato occorre ripetere il test con lo stesso campione per evitare eventuali errori. Effettuare un nuovo prelievo e ripetere il test se il campione produce risultati non interpretabili. Si raccomanda di annotare le procedure di controllo interno ogniqualvolta si riesamina il campione.

### Controlli Esterni

Il controllo di qualità deve essere effettuato per ogni nuovo kit. È necessario eseguire ulteriori test di verifica a controllo della *Legionella pneumophila*, come stabilito dalla legislazione locale o regionale e dalle procedure di controllo di laboratorio. I controlli esterni positivi e negativi sono forniti separatamente.

## 12. Limiti del Test

- Un risultato negativo non esclude la possibilità di infezione da *Legionella pneumophila* del sierogruppo 1. La concentrazione dell'antigene potrebbe essere al di sotto della soglia di rilevazione del test. Si raccomanda di utilizzare colture cellulari in pazienti sospetti di polmonite al fine di determinare se questa dipende da altri fattori o da un'infezione da *Legionella pneumophila* del sierogruppo 1.
- Il test fornisce una diagnosi di sospetta infezione da *Legionella pneumophila* del sierogruppo 1. Al fine di emettere una diagnosi corretta, devono essere effettuati test sierologici, colture cellulari ed altri esami clinici.

- La sensibilità del test immunologico può determinare risultati positivi su campioni contenenti anticorpi eterofili. Se l'interpretazione qualitativa risulta essere imprecisa dopo esami clinici, è necessario ricorrere ad altri metodi di conferma.
- La secrezione dell'antigene della Legionella può avvenire già dopo tre giorni dalla comparsa dei primi sintomi. L'antigene può comunque continuare ad essere secreto fino ad un anno dal contagio<sup>7</sup>. Si può avere un risultato positivo con il test NADAL<sup>®</sup> sia durante l'infezione che in seguito a precedenti infezioni; al fine di effettuare una diagnosi corretta occorre quindi effettuare colture cellulari, test sierologici e ricerca dell'antigene.

### 13. Performance

#### Sensibilità clinica e specificità (Studio retrospettivo)

Laboratori clinici (USA e Olanda) hanno testato 324 campioni congelati comparando il test NADAL<sup>®</sup> Legionella con test effettuati tramite coltura cellulare. I risultati sono riportati qui sotto:

		Cultura cellulare		
		+	-	
Test NADAL <sup>®</sup>	+	95	11	106
Legionella	-	10	208	218
		105	219	324

Sensibilità:  $95/105 \times 100 = 90.5\%$  (95% CI: 83.4-94.8)

Specificità:  $208/219 \times 100 = 95.0\%$  (95% CI: 91.2-97.5)

#### Specificità analitica

È stata analizzata l'urina appena prelevata di 49 pazienti con il test NADAL<sup>®</sup> Legionella, con risultati negativi nel 100% dei casi.

#### Interferenza e reazioni incrociate con altre infezioni del tratto respiratorio

Sono stati analizzati 99 campioni di urina in pazienti con diagnosi di altre infezioni del tratto respiratorio (ad eziologia batterica) con il test NADAL<sup>®</sup> Legionella (84 confermati, 15 sospetti). I risultati hanno mostrato una mancanza di reattività su 98 dei 99 campioni analizzati (99.0%).

#### Interferenza e reazioni incrociate con batteri

Al fine di confermare la specificità del test NADAL<sup>®</sup> Legionella, sono state analizzate colture batteriche presenti nel tratto respiratorio.

Le colture batteriche sono state analizzate alla concentrazione di  $1 \times 10^8$  cfu/ml. Ciascun test ha riportato risultati negativi.

Al fine di confermare la mancanza di interferenze da altre specie batteriche, è stato aggiunto antigene purificato della Legionella alle colture batteriche presenti nel tratto respiratorio.

La concentrazione dell'antigene della Legionella era  $1 \times 10^5$  cfu/ml. Ciascun test ha riportato risultati positivi.

<i>Legionella pneumophila</i> SG2	<i>Legionella gormanii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG3	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG4	<i>Legionella feeleii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Legionella pneumophila</i> SG6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

#### Urina e droghe

Al fine di determinare eventuali interferenze o reazioni incrociate con il test NADAL<sup>®</sup> Legionella sono stati analizzati i seguenti parametri e farmaci (antibiotici). L'antigene della *Legionella pneumophila* è stato aggiunto ad una concentrazione di  $4.5 \times 10^4$  cfu/mL. Inoltre ogni composto è stato analizzato in assenza dell'antigene *Legionella pneumophila*. Nessuno dei parametri elencati ha interferito o creato reazioni incrociate con i risultati.

Glucosio	2000mg/dL	Protein - BSA	500mg/dL
Urea	2000mg/dL	Bilirubina	20mg/dL
Acido Ascorbico	100mg/dL	Rifampicina	0.09mg/mL
Eritrociti	106/mL	Eritromicina	0.067mg/mL
Leucociti	106/mL	Ciprofloxacina	0.22mg/mL

#### Soglia di rilevazione

La soglia di rilevazione del test NADAL<sup>®</sup> Legionella è stata fissata a  $5 \times 10^4$ . L'antigene del sierogruppo 1 della *Legionella pneumophila* ATCC 323152 è stato preparato usando agar BCYE. È stata eseguita una diluizione alla concentrazione di lavoro. La soglia di rilevazione del test NADAL<sup>®</sup> Legionella è stato fissato alle concentrazioni indicate. Il test è stato eseguito in due repliche. I risultati sono stati rilevati dopo 15 minuti.

#### Studio di riproducibilità

La riproducibilità del test NADAL<sup>®</sup> Legionella è stata valutata da tre diversi laboratori clinici. Il test NADAL<sup>®</sup> Legionella è stato confrontato contro un panel di sei campioni, due dei quali negativi e quattro positivi. I campioni forti/deboli positivi sono stati purificati dall'antigene della Legionella. Ai campioni negativi sono stati aggiunti antigeni della Legionella al di sotto della soglia di rilevazione. La riproducibilità per il test NADAL<sup>®</sup> Legionella è risultata essere pari al 100%.

#### 14. Bibliografia

- Edelstein, P.H. and R. D. Meyer. "Legionella Pneumonias." In Respiratory infections: Diagnosis and Management, 3<sup>rd</sup> Edition, James E. Pennington, editor. New York: Raven Press, Ltd. 1994
- Marston, B.J., H.B. Lipman, R.F. Breiman. Surveillance for legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch.Intern. Med 1994;154:2417:2422
- Horwitz, M.A., B.J. Martson, C.V. Broome, and R.F. Freiman. Prospects for vaccine development. Presented at the 4<sup>th</sup> International Symposium on Legionella, 1992. In: Barbaree, J. M., R.F. Breiman, and A.P. DuFour, eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology, 1993.
- Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr. and L.J. Wheat. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:605-607.
- Lindsay, D.S.J., W.H. Abraham, P. Christie, F. Johnston and G.F.S. Edwards. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J. Med. Microbiol. 2004; 53:183-187.
- Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D.R. Hillyard. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Microbiol. 38; 2000; 1709-1712.
- Kohler, R.B., Winn, W.C., Wheat, L.J. Onset of the duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 601-605.
- Jonas, Daniel, A. Rosenbaum, S. Weyrick and S. Bhakdi. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA and Legionellae in Bronchoalveolar fluid. J. Clin. Microbiol. 33; 1995; 1247-1252.

Rev: 2010-02-16 IF

## 1. Zastosowanie

Test NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen Test jest szybkim, immunochromatograficznym testem in-vitro służącym do jakościowego wykrywania serogrupy 1 antygenów *Legionella pneumophila* w ludzkim moczu. Test pomaga w postawieniu wstępnej diagnozy choroby legionistów u pacjentów z objawami zapalenia płuc w połączeniu z hodowlą na pożywkach oraz innymi metodami.

## 2. Wprowadzenie i znaczenie diagnostyczne

*Legionella pneumophila* Serogrupa 1 jest aerobową, gram-ujemną bakterią, o kształcie krótkiej pałeczki. *Legionella pneumophila* wywołuje chorobę legionistów oraz gorączkę Pontiac. Rocznie szacuje się, że od 25.000 do 100.000 przypadków zachorowań ma miejsce w USA. Około 5% do 30% ludzi z chorobą legionistów umiera.

Bakteria *Legionella pneumophila* powoduje choroby płuc, przede wszystkim zapalenie płuc. Dodatkowo, inne infekcje płucne mogą się rozprzestrzenić poprzez system krwionośny lub limfatyczny, infekując serce, mózg, nerki, wątrobę i/lub śledzionę. Wczesne objawy choroby to: gorączka, dreszcze, bóle mięśni i brak apetytu. Objawy takie jak kaszel lub zator płucny z reguły nie występują. W miarę rozwoju choroby, pojawia się silny suchy kaszel. Połowa ludzi chorujących na chorobę legionistów cierpi na duszności. W wielu przypadkach gorączka sięga 40°C.

Powszechnie przyjętymi metodami służącymi do wykrycia *Legionella pneumophila* są: hodowla na pożywkach, metoda bezpośrednich przeciwciał fluorescencyjnych (DFA), metoda pośrednich przeciwciał fluorescencyjnych (IFA), testy immunoenzymatyczne (EIA), reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), do których używa się próbek pochodzących z układu oddechowego: popłuczyny oskrzelowe, płwocina, aspirat przezchtawiczny, biopsja płuc. Badania wykazały, że w ostrej fazie choroby *Legionella pneumophila* serogrupy 1 występuje także w moczu, dzięki czemu wykrycie antygenów stało się jedną z popularniejszych metod diagnosty laboratoryjnej. NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen Test został stworzony do wykrywania serogrup 1 antygenów *Legionella pneumophila* w moczu.

## 3. Zasady działania testu

Test NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen wykorzystuje do wykrycia serogrupy 1 antygenów *Legionella pneumophila* kombinację poliklonalnych przeciwciał przeciw antygenom *Legionella pneumophila*.

Aby rozpocząć badanie testem NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen należy dodać mocz do odpowiedniego otworu w kasiecie testowej. Próbka jest absorbowana przez pole absorpcyjne i zaczyna się przemieszczać do pola koniugacji, które zawiera sproszkowany koniugat przeciwciał złota, które są specyficzne dla antygenów *Legionella pneumophila*. Jeżeli antygeny *Legionella* są obecne w próbce moczu, formuje się kompleks typu „pół-sandwich” z przeciwciał i antygenów.

Następnie immunokompleks przemieszcza się, pod wpływem sił kapilarnych, po nitrocelulozowej membranie do pola testowego S, które zawiera przeciwciała przeciw antygenom *Legionella pneumophila*. Przeciwciała wiążą immunokompleks typu „pół-sandwich”, aby uformować immunokompleks typu „cały-sandwich”. W ten sposób, kiedy „cały-sandwich” jest uformowany, powstaje widoczna różowa linia w polu testowym S.

W przypadku braku antygenów *Legionella* w próbce moczu, immunokompleks typu „sandwich” się nie formuje i otrzymujemy wynik negatywny.

Test posiada wewnętrzną kontrolę. Różowa linia w polu kontrolnym musi pojawić się zawsze, niezależnie od obecności lub braku antygenów *Legionella*.

## 4. Części składowe zestawu

- 10 NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen kasetek testowych oraz 10 pipet jednorazowego użytku (membrana jest pokryta kombinacją poliklonalnych przeciwciał przeciw antygenom serogrupy 1 antygenów *Legionella pneumophila*).
- 1 ulotkę informacyjną

## 5. Dodatkowo potrzebne materiały

- Stoper
- Pojemnik na próbkę

## 6. Data ważności i przechowywanie

Test NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen powinien być przechowywany w temp. pokojowej (15°-30°C) w szczelnie zamkniętym opakowaniu. Nie zamrażać zestawu testowego.

## 7. Uwagi środki ostrożności

- Tylko do diagnostyki *In-vitro*.
- Do przeprowadzania testu może zostać użyta tylko pipeta dołączona do zestawu testowego.
- Używać osobnych pipet dla każdej próbki i kontroli.
- Test powinien być szczelnie zapakowany do momentu bezpośrednio poprzedzającego użycie testu.
- Wszystkie próbki powinny być traktowane, jako potencjalnie niebezpieczne i powinno się z nimi obchodzić w taki sam sposób jak z próbkami zakaźnymi.
- W czasie przeprowadzania testu należy założyć jednorazowe rękawiczki, a po jego zakończeniu dokładnie umyć ręce. Uwaga:

Użytkownik powinien odnieść się do odpowiedniego rozdziału instrukcji CDC-NIH „Bezpieczeństwo w mikrobiologii i biomedycynie laboratoryjnej”, edycja piąta, 2007.

- Unikać kontaktu z oczami.
- Kasetka testowa i wszelkie materiały testowe muszą zostać usunięte po przeprowadzeniu testu zgodnie z obowiązującymi przepisami.
- Nie używać zestawów testowych po upływie daty ważności.
- Zestaw testowy jest przeznaczony do użytku jednorazowego.

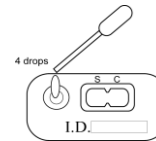
## 8. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

Próbka moczu musi zostać pobrana do czystego, sterylnego pojemnika. Próbkę moczu mogą zostać schłodzone (2°C-8°C) i przechowywane w tej temp. do 72 godzin. Próbkę mogą być zamrożone (-20 °C) i przechowywane do 2 lat. Przed testem próbki muszą zostać doprowadzone do temp. pokojowej (15°C – 30°C).

## 9. Przeprowadzanie testu

Doprowadzić próbki i/lub kontrole do temp. pokojowej (15°C – 30°C) przed przeprowadzeniem testu. Wyjąć test z opakowania i położyć na płaskiej powierzchni. Opisać kasetkę testową danymi pacjenta.

1. Umieścić 4 krople (około 0.15 ml) próbki w okrągłym polu (ilustracja poniżej), poczekać aż pojawią się kolorowe linie.



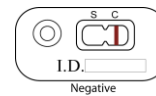
2. Odczytać wyniki najpóźniej po upływie 15 minut od przeprowadzenia testu. W zależności od koncentracji antygenów w próbce, może najpierw pojawić się linia testowa S. Pojawienie się od razu linii kontrolnej nie wskazuje na zakończenie testu. Interpretacja wyników po upływie 15 minut może prowadzić do fałszywych wyników.



## 10. Interpretacja wyników

### Wynik negatywny

Wynik testu jest negatywny, jeżeli kolorowa linia pojawi się tylko w polu kontrolnym C.



### Wynik pozytywny

Wynik testu jest pozytywny, jeżeli kolorowa linia pojawi się zarówno w polu testowym S oraz w polu kontrolnym C.

Każda kolorowa linia w polu S powinna zostać zinterpretowana, jako wynik pozytywny. Kolorowe linie mogą pojawiać się w różnych odcieniach i w różnych stopniach intensywności. Próbkę zawierające antygen *Legionella* na poziomie wartości progowych mogą spowodować pojawienie się bardzo słabo widocznej linii, także po upływie 15 minut od przeprowadzenia testu. Jednakże nie należy interpretować wyników testu po upływie 15 minut.



### Wynik nieważny

Test jest nieważny, jeżeli nie pojawi się linia w polu kontrolnym C, nawet w przypadku, kiedy pojawi się linia w polu testowym S. Jeżeli linia kontrolna C nie pojawi się, oznacza to, że test jest nieważny i powinien zostać powtórzony. Pojawienie się linii testowej S po 15 minutach od przeprowadzenia testu nie powinno się interpretować jako wynik pozytywny.

## 11. Kontrola jakości

### Kontrola wewnętrzna

Pojawienie się linii kontrolnej C jest wewnętrzną (pozytywną) kontrolą. Prawidłowo przeprowadzona procedura, prawidłowy przepływ próbek, oraz odpowiednie wykonanie testu jest potwierdzone przez pojawienie się linii kontrolnej C na pasku. Jeżeli nie pojawi się linia w polu kontroli C, to test jest nieważny.

Czyste tło jest wewnętrzną (negatywną) kontrolą. Tło, na którym pojawiają się wyniki powinno być koloru od białego do jasno różowego i nie powinno wpływać na odczytywanie uzyskanych wyników. Jeżeli wynik jest trudny do interpretacji, test powinien zostać powtórzony przy pomocy tej samej próbki, aby wyeliminować potencjalny błąd.

Przeprowadzić nowy test z użyciem tej samej próbki, Zaleca się przeprowadzenie wewnętrznej kontroli jakości w przypadku testów z nowej serii.

## Kontrola zewnętrzna

Kontrolne jakości powinny być przeprowadzone dla wszystkich testów nowej serii. Dodatkowe badania kontrolne Legionella pneumophila muszą zostać przeprowadzone zgodnie z wymogami prawa, wymogami posiadania atestów i własnej laboratoryjnej kontroli jakości. Wewnętrzne kontrole pozytywne i negatywne nie są zawarte w zestawie i mogą być dostarczone na życzenie.

## 12. Ograniczenia testu

- Wynik negatywny na obecność antygenu nie wyklucza możliwości zainfekowania Legionella pneumophila. Stężenie antygenu może być poniżej wykrywalnego poziomu przez test. Hodowla na pożywkach jest wskazana u pacjentów z podejrzeniem zapalenia płuc, aby określić czy inne bakterie nie są odpowiedzialne za infekcję.
- Test NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen dostarcza tylko wstępnej diagnozy, dotyczącej tylko infekcji spowodowanej przez serogrupę 1 Legionella pneumophila. W celu uzyskania dokładnej diagnozy należy zastosować hodowle na pożywkach, testy serologiczne oraz metody detekcji antygenów w połączeniu z badaniami klinicznymi.
- Czułe badanie immunologiczne może dać wynik pozytywny z próbkami zawierającymi przeciwciała heterofilne. Jeżeli interpretacja jakościowa jest sprzeczna z badaniami klinicznymi, powinny zostać przeprowadzone kolejne testy wykonane metodami alternatywnymi.
- Wydzielenie się antygenu Legionelli rozpoczyna się już 3 dni przed wystąpieniem objawów choroby. Jednakże, antygen może być wydzielany nawet po upływie jednego roku. Wynik pozytywny testu NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen może wystąpić pod wpływem obecnej jak również wcześniej przebytej infekcji; dlatego też w celu postawienia prawidłowej diagnozy należy zastosować hodowle na pożywkach, testy serologiczne oraz metody detekcji antygenów w połączeniu z badaniami klinicznymi.

## 13. Charakterystyka Testu

### Kliniczna czułość i swoistość (Badanie retrospektywne)

Trzy kliniczne ośrodki (w USA i Holandii) przeprowadziły testy trzydziestu dwudziestu czterech (324) zamierzonych próbek przy użyciu testu kasetowego NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen. Próbki te, zostały wcześniej przetestowane na obecność Legionella przez hodowle na pożywkach. Poniżej przedstawiono wyniki badań.

		Hodowla na pożywkach		
		+	-	
NADAL <sup>®</sup> Legionella Urine Antygen Test	+	95	11	106
	-	10	208	218
		105	219	324

Czułość:  $95/105 \times 100 = 90.5\%$  (95% CI: 83.4-94.8)

Swoistość:  $208/219 \times 100 = 95.0\%$  (95%CI: 91.2-97.5)

### Swoistość analityczna

Czterdzieści dziewięć (49) świeżych próbek moczu od zdrowych dawców zostały pobrane i poddane badaniom przez jeden ośrodek kliniczny. Sto procent (100%) próbek dało wynik negatywny na obecność Legionella pneumophila po przetestowaniu ich testem NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen.

### Reakcje krzyżowe z innymi infekcjami dróg oddechowych

Dziewięćdziesiąt dziewięć (99) próbek moczu pochodzących od pacjentów, u których zdiagnozowano inne infekcje dróg oddechowych (potwierdzono 84 poprzez kultury bakterii, 15 nie było potwierdzonych) zostało przebadanych testem NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen. Wyniki w 98 z 99 przypadków wykazały brak reakcji krzyżowych.

### Bakteryjne reakcje krzyżowe oraz interferencje

W celu potwierdzenia swoistości analitycznej testu NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen przetestowano kultury bakterii ( $1 \times 10^8$ ) znalezione w drogach oddechowych. Wszystkie wyniki wykazały zgodnie z oczekiwaniami wynik negatywny.

Aby stwierdzić nakładanie się wyników w teście NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen dodano oczyszczony antygen Legionella o koncentracji  $1 \times 10^5$  cfu/ml. Wszystkie wyniki wykazały zgodnie z oczekiwaniami wynik pozytywny.

Legionella pneumophila SG2	Legionella gormanii	Proteus mirabilis
Legionella pneumophila SG3	Legionella longbeachae	Citrobacter freundii
Legionella pneumophila SG4	Legionella feeleii	Enterobacter cloacae
Legionella pneumophila SG5	Staphylococcus aureus	Serratia marcescens
Legionella pneumophila SG6	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas aeruginosa
Legionella bozemanii	Enterococcus faecalis	Candida albicans
Legionella micdadei	Escherichia coli	Streptococcus pneumoniae
Legionella dumoffii	Klebsiella pneumoniae	Haemophilus influenzae

### Reakcje krzyżowe z powszechnymi składnikami moczu i lekami

Aby stwierdzić możliwe reakcje krzyżowe z testem NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen przebadano mocz, który zawierał następujące związki lub leki. Oczyszczony antygen Legionella pneumophila w stężeniu  $4.5 \times 10^4$  cfu/ml został dodany do próbki. Dodatkowo, każdy składnik został przetestowany niedodając antygenu Legionella pneumophila. Żadna substancja wymieniona poniżej o określonej koncentracji nie wpłynęła na wynik testu i nie wywołała niepożądanego reakcji krzyżowej.

Glukoza	2000mg/dL
Mocznik	2000mg/dL
Kwas askorbinowy	100mg/dL
Erytrocyty	$10^6$ /mL
Leukocyty	106/mL
Białko – BSA	500mg/dL
Billirubina	20mg/dL
Ryfampicyna	0.09mg/mL
Erytromycyna	0.067mg/mL
Cyprofloksacyna	0.22mg/mL

### Granica wykrywalności

Granica wykrywalności dla testu NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen została określona na  $5 \times 10^4$ . Serogrupa 1 ATCC 323152 Legionella pneumophila została wyhodowana przy użyciu BCYE agar. Zostało przeprowadzone rozcieńczenie stężenia, którym następnie przeprowadzono testy. Granica wykrywalności testu kasetowego NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen została określona na podstawie tych stężeń. Test został przeprowadzony z dwoma powtórzeniami. Wyniki zostały stwierdzone i zapisane po 15 minutach.









### Badanie naukowe reprodukcyjności










Reprodukcyjność testu NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen Test została określona przez trzy ośrodki kliniczne. Test NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen został przebadany na jednym panelu z sześcioma (6) próbkami, z których cztery (4) o różnej koncentracji były pozytywne, a dwie (2) negatywne. Wysoko i nisko skoncentrowane próby pozytywne pochodziły od oczyszczonego antygenu Legionella. Próbki negatywne były regularnie sprawdzanymi próbkami moczu lub próbkami z antygenem Legionella poniżej wykrywalnego poziomu. Trzy (3) różne zespoły laboratoryjne przebadaly każdą próbkę, w różnych laboratoriach w trakcie trzech (3) dni. Łączna reprodukcyjność dla testu NADAL<sup>®</sup> Legionella Urine Antygen wynosiła 100%.

## 14. Bibliografia

- Edelstein, P.H. and R. D. Meyer. "Legionella Pneumonias." In Respiratory infections: Diagnosis and Management, 3<sup>rd</sup> Edition, James E. Pennington, editor. New York: Raven Press, Ltd. 1994
- Marston, B.J., H.B. Lipman, R.F. Breiman. Surveillance for legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch.Intern. Med 1994;154:2417:2422
- Horwitz, M.A., B.J. Martson, C.V. Broome, and R.F. Freiman. Prospects for vaccine development. Presented at the 4<sup>th</sup> International Symposium on Legionella, 1992. In: Barbaree, J. M., R.F. Breiman, and A.P. DuFour, eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology, 1993.
- Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr. and L.J. Wheat. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:605-607.
- Lindsay, D.S.J., W.H. Abraham, P. Christie, F. Johnston and G.F.S. Edwards. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J. Med. Microbiol. 2004; 53:183-187.
- Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D.R. Hillyard. Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Micbiol. 38; 2000; 1709-1712.
- Kohler, RB, Winn, WC, Wheat, LJ. Onset of the duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 601-605.
- Jonas, Daniel, A. Rosenbaum, S. Weyrick and S. Bhakdi. Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA and Legionellae in Bronchoalveolar fluid. J. Clin. Micbiol. 33; 1995; 1247-1252.

Rev. 2011-11-18 AM

Symbol	English	Deutsch	Français	Nederlands	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Gebruiksaanwijzing	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conform Europese richtlijnen	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	In vitro diagnostisch gebruik	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Catalogus nummer	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Lot nummer	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Geschikt voor <n> tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungs-temperatur	Température de conservation	Opslag temperatuur	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Houdbaarheids datum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany
<b>Cont.</b>	Content	Inhalt	Conditionnement	Inhoud	Contenido	Contenuto

Symbol	Polski	Suomi	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Patrz: ulotka informacyjna	Katso käyttöohjeet	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Znak zgodności CE	CE-merkitty	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Tylko do użytku in-vitro	In vitro-diagnostiikka	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	In vitro diagnostik	in vitro διαγνωστικό
	Numer katalogowy	Luettelo-numero	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalognummer	Αριθμός καταλόγου
	Numer serii	Eränumero	No do lote	Lot nummer	Batchnummer	Αριθμός Παρτίδος
	Wystarczające na "n" powtórzeń	Sisältää tarvikkeet "n" testiin		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura przechowywania	Säilytyslämpötila	Temperatura de conservação	Opbevarings-temperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Data ważności	Viimeinen käyttöpäivä	Prazo de validade	Udløbsdato	Utgångsdatum	Ημερομηνία λήξης
	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Straße 9 47441 Moers Germany
<b>Cont.</b>	Zawartość	Sisältö	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο



**NOTES:**





**NOTES:**



**NOTES:**

## CONTACT:

www.nal-vonminden.com  
info@nal-vonminden.de

### **Team Germany:**

#### Regensburg

Tel: +49 (941) 29010-0  
Fax: +49 (941) 29010-50

#### Moers

Tel: +49 (2841) 99820-0  
Fax: +49 (2841) 99820-1

### **Team Austria:**

Tel: +49 (0) 941 29010-38  
Free Tel: 0800 291 565  
Fax: +49 (0) 290 10 50  
Free Fax: 0800 298 197

### **Team UK & Ireland:**

Tel: +49 (0) 941 29010-35  
Free Tel –UK: 0808 234 1237  
Free Tel – IRE: 1800 555 080  
Fax: +49 (0) 941 29010-50  
Free Fax:

### **Team Spain:**

Tel: +49 (0) 941 280 963 80  
Free Tel: 900 938 315  
Fax: +49 (0) 941 29010-50  
Free Fax: 900 984 992

### **Team France:**

France Tel: 0800 915 240  
France Fax: 0800 564 720  
Swiss Tel: 0800 564 720  
Swiss Fax: 0800 837 476  
Belgium Tel: 0800 718 82  
Belgium Fax: 0800 747 07  
Lux. Tel: 800 211 16  
Lux. Fax: 800 261 79

### **Team Poland:**

Tel: +49 (0) 941 29010-20  
Free Tel: 00 800 491 15 95  
Fax: +49 (0) 941 29010-50  
Free Fax: 00 800 491 15 94

### **Team Italy:**

Tel: +49 (0) 941 29010-34  
Fax: +49 (0) 941 29010-50

### **Team Netherlands:**

Tel: +31 (0) 30 75 600  
Free Tel: 0800 0222 890  
Fax: +31 (0) 70 30 30 775  
Free Fax: 0800 024 9519

### **ELISA - Sales Lab Team:**

Tel: +49 (941) 29010-40  
Fax: +49 (941) 29010-50



nal von minden GmbH  
Carl-Peschken-Straße 9  
47441 Moers  
Germany

[www.nal-vonminden.de](http://www.nal-vonminden.de)