



ISTRUZIONI PER L'USO

LEGIONELLA PNEUMOPHILA CARD PLUSTEST IMMUNOCROMATOGRAFICO RAPIDO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELL'ANTIGENE DELLA *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* SIEROGRUPPO 1 IN CAMPIONI DI URINA**1 – INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO**Per solo uso diagnostico *in Vitro*

La Malattia dei Legionari, che prende il nome dall'epidemia scoppiata nel 1976 in occasione della convention della Legione Americana a Philadelphia, è causata dalla *Legionella pneumophila* ed è caratterizzata da una malattia respiratoria febbrile acuta che va da una malattia lieve ad una polmonite fatale. La malattia si presenta sia in forma epidemica che endemica e casi sporadici non sono facilmente distinguibili da altre infezioni respiratorie solamente in base ai sintomi clinici. Si stima che ogni anno negli Stati Uniti si verifichino dai 25.000 ai 100.000 casi di infezione da *Legionella*. Il tasso di mortalità risultante, che varia dal 25% al 40%, può essere ridotto se la malattia viene diagnosticata rapidamente e se viene istituita precocemente un'adeguata terapia antimicrobica. Tra i fattori di rischio noti vi sono l'immunosoppressione, il fumo di sigaretta, il consumo di alcol e le malattie polmonari concomitanti. I giovani e gli anziani sono particolarmente suscettibili. La *Legionella pneumophila* è responsabile dell'80-90% dei casi di infezione da *Legionella* riportati, con il sierogruppo 1 che rappresenta oltre il 70% di tutte le legionellosi. Gli attuali metodi di laboratorio per individuare la polmonite causata da *Legionella pneumophila* richiedono un campione respiratorio (ad esempio espettorato, lavaggio bronchiale, aspirato transtracheale, biopsia polmonare) o sieri accoppiati (acuto e convalescente) per una diagnosi accurata. Il Legionella Pneumophila Card Plus Mascia Brunelli consente la diagnosi precoce dell'infezione da *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 attraverso la rilevazione di uno specifico antigene solubile presente nelle urine dei pazienti affetti da legionellosi. L'antigene di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 è stato rilevato nelle urine già tre giorni dopo la comparsa dei sintomi. Il test è rapido, in quanto fornisce un risultato entro 15 minuti, e utilizza un campione di urina comodo per la raccolta, il trasporto e la successiva individuazione degli stadi precoci e tardivi della malattia. Il kit include un controllo positivo per *Legionella*.

2 – PRINCIPIO DEL METODO

Legionella Pneumophila Card Plus è un metodo immunocromatografico assolutamente non invasivo, semplice da eseguire, rapido e molto preciso nel risultato, per la determinazione di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 in campioni di urina.

Nel device vi è una strip costituita da una membrana di nitrocellulosa pre-rivestita con anticorpi policlonali specifici per *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) in corrispondenza della banda test e con anticorpi policlonali di coniglio contro una proteina specifica, sulla linea di controllo (C). Il tampone assorbente della strip viene spruzzato con una soluzione contenente anticorpi policlonali anti-*L. pneumophila* coniugati con lattice di polistirene rosso e con una soluzione contenente una proteina legante specifica coniugata con lattice di polistirene blu, formando complessi coniugati colorati. Se il campione è positivo, gli antigeni del campione diluito reagiscono con il complesso di colore rosso (anticorpi policlonali anti-*L. pneumophila* e microsferi di polistirene rosso), precedentemente pre-essiccata sul tampone assorbente. La miscela si muove quindi lungo la membrana per azione capillare. Mentre il campione scorre, trascina anche i complessi coniugati. Gli anticorpi anti-*L. pneumophila* presenti sulla membrana (linea del test) catturano il coniugato colorato e si formerà una linea colorata (rossa). Questa banda viene utilizzata per interpretare il risultato.

Se il campione è negativo, non c'è presenza di antigeni di *L. pneumophila* oppure gli antigeni possono essere presenti in una concentrazione inferiore al valore limite di rilevabilità, per cui la reazione non avverrà con il complesso coniugato di colore rosso. Gli anticorpi anti-*L. pneumophila* presenti sulla membrana (linea di test) non cattureranno il complesso coniugato antigene-rosso (non formato), per cui non apparirà la linea rossa.

Indipendentemente dal fatto che il campione sia positivo o meno, la miscela continua a muoversi attraverso la membrana verso gli anticorpi specifici immobilizzati posti nella linea di controllo. Gli anticorpi anti-specifici presenti sulla membrana cattureranno il complesso blu-coniugato del controllo e apparirà sempre la banda di controllo. La presenza di questa linea blu serve a: 1) verificare che sia stato aggiunto un volume sufficiente, 2) verificare che il flusso sia corretto e 3) come un controllo interno per i reagenti.

3 – MATERIALI FORNITI – CONFEZIONAMENTO

Prodotto	Tipologia	REF	Confezione
Legionella Pneumophila Card Plus	Test immunocromatografico	VQ84100P (25 test)	25 buste di alluminio sigillate contenenti la card, un essiccante e una pipetta di plastica. 1 flacone di vetro con tappo gocciolatore contenente il diluente. (1 x 2,5 mL). 1 flacone di vetro con tappo gocciolatore contenente il controllo positivo: componenti non-infettivi, sodio azide (NaN ₃) come conservante (1 x 0,5 mL). 25 tubi di plastica per il test. Imballo secondario: scatola di cartone.

4 – MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Dispositivi per la raccolta dei campioni; Guanti monouso; Cronometro.

5 – PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- Tutte le operazioni riferite all'esecuzione del test devono essere condotte in accordo alle Buone Pratiche di Laboratorio.
- Legionella Pneumophila Card Plus è un kit qualitativo per l'uso diagnostico *in vitro*, per il solo uso professionale; deve essere utilizzato da personale di laboratorio qualificato e adeguatamente addestrato.
- Questo prodotto è classificato non pericoloso in accordo alla Legislazione Europea vigente.
- Evitare di toccare le strisce di nitrocellulosa con le dita.
- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
- Ciascuna card deve essere usata una sola volta.
- Non usare reagenti di altri lotti o di altri kit.
- La card deve rimanere nella busta chiusa fino al suo utilizzo; e comunque eseguire il test entro 2 ore dall'apertura della busta.
- Non usare la card se la busta è danneggiata.
- La presenza di linee gialline nella finestra dei risultati visibili prima dell'esecuzione del test è del tutto normale. Questo non influenza la funzionalità del test.
- Usare i guanti per la manipolazione dei campioni.
- Eliminare i guanti, il diluente, le provette e le card utilizzate rispettando le regole di laboratorio utilizzando appositi contenitori per il rischio biologico.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza e non usare il test se la confezione è danneggiata. La qualità dei reagenti non può essere garantita oltre la data di scadenza o se il kit è conservato in condizioni non appropriate.
- Il Certificato di Analisi e la Scheda Dati di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito web: www.masciabrunelli.it.
- Se il dispositivo contiene materie prime di origine animale, la materia prima in questione proviene da animali che sono stati macellati in un macello autorizzato e che, a seguito di un'ispezione antemortem, non hanno mostrato alcun segno di malattia trasmissibile all'uomo o agli animali. In ogni caso si raccomanda di





trattare il kit come potenzialmente infettivo, e di manipolarlo osservando le consuete precauzioni specifiche: non ingerire, inalare o far entrare in contatto con pelle, occhi, mucose.

- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.
- Comunicare a Mascia Brunelli Spa e alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo diagnostico in vitro. complaint@masciabrunelli.it

6 – CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA

Conservare nella confezione sigillata in frigorifero o a temperatura ambiente (2-30°C/36-86°F). Il kit è stabile fino alla data di scadenza stampata sulla confezione se opportunamente conservato. I dispositivi (card) devono rimanere nelle buste chiuse fino all'utilizzo. Non usare la card dopo 2 ore dall'apertura. Non congelare.

7 – RACCOLTA DEL CAMPIONE E PREPARAZIONE

I campioni di urina devono essere raccolti in contenitori standard. I campioni possono essere conservati a temperatura ambiente (15-30°C) se analizzati entro 24 ore dalla raccolta. Alternativamente, i campioni possono essere stoccati a 2-8°C fino a 14 giorni o a -10°C/-20°C per i periodi più lunghi prima di essere testati. Se necessario, i campioni di urina devono essere spediti in contenitori a perfetta tenuta a 2-8°C o congelati. Portare i campioni a temperatura ambiente prima di processarli.

8 – PROCEDIMENTO

Prima di effettuare il test lasciare che le card, i campioni e il diluente raggiungano temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F). Non aprire le buste con le card fino a quando non si è pronti ad effettuare l'analisi.

Procedimento per i campioni

- Utilizzare per ciascun campione un tubo per dosaggio. Aggiungere nel tubo 100-150 µL (3 gocce) di urina da testare e 50 µL (1 goccia) di Tampone; miscelare. (Fig. 1 e 2)
- Rimuovere la card dalla busta protettiva. Identificarla con i dati del paziente.
- Dispensare, con la pipetta gocciolatrice, 3 gocce di campione (100-150 µL) nella finestra circolare della card (S), far partire il cronometro. (Fig. 3)
- Leggere il risultato 15 minuti dopo aver dispensato il campione. Non superare i 15 minuti.



Procedimento per i controlli

Per i controlli positivo e negativo seguire la stessa procedura dei campioni, cominciando dal punto 3.

9 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati devono essere interpretati nel seguente modo:



	Legionella	Interpretazione dei risultati
1.	-	Assenza di <i>Legionella pneumophila</i> . Nessuna infezione causata da <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 1. Risultato negativo.
	BLU	
2.	+	Presenza di <i>Legionella pneumophila</i> . Infezione causata da <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 1. Risultato positivo.
	BLU-ROSSO	
3.	ALTRI RISULTATI	Risultati non validi, si consiglia di ripetere il test usando lo stesso campione con un'altra card.

NON VALIDO: Assenza totale di linee di controllo (BLU) indipendentemente dalla comparsa o meno delle linee test (ROSSO). Volume insufficiente del campione, tecniche procedurali errate o deterioramento dei reagenti sono le ragioni principali della mancanza delle linee di controllo. Rivedere la procedura e ripetere il test con un nuovo dispositivo. Se i sintomi o la situazione persistono e contattare il distributore locale.

NOTA ALL'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'intensità della linea test rossa (T) nella finestra dei risultati varia in funzione della concentrazione di antigeni presenti nel campione, tuttavia, non è possibile effettuare nessuna valutazione quantitativa così come nessun tasso di aumento degli antigeni.

10 – CONTROLLO QUALITÀ INTERNO

In ogni striscia reattiva è inclusa la procedura di Controllo Qualità interno. La formazione della banda di controllo "C" conferma che la tecnica procedurale è corretta e che il volume del campione è sufficiente.

11 – VALORI ATTESI

Sono state caratterizzate più di 50 specie di *Legionella* e 25 specie sono note per causare malattie nell'uomo. La maggior parte delle infezioni umane è causata da *Legionella pneumophila*, che è responsabile di circa il 90% dei casi clinici identificati, e il sierogruppo predominante è il sierogruppo 1. Negli ultimi anni, le sorgenti termali sono state riconosciute come una delle principali fonti di focolai di legionellosi. In Giappone, Spagna e Francia sono stati segnalati diversi focolai e casi di infezione da *legionella* associati a sorgenti termali.

12 – CARATTERISTICHE

A. Sensibilità analitica (limite di rilevabilità)

Il valore del limite di rilevabilità è 12.5 ng/mL. (pool di diversi sieri con *Legionella pneumophila*).

B. Sensibilità e Specificità Cliniche

È stata eseguita una valutazione, con 149 campioni di urina, confrontando i risultati ottenuti con il test immunocromatografico (*Legionella Pneumophila Card Plus Mascia Brunelli*) e un altro test rapido presente in commercio (*Binax Now® Legionella Urinary Antigen, Alere*).





I risultati sono stati i seguenti:

Sensibilità 100,0% (88,8-100,0%)

Specificità 99,2% (95,4-100,0%)

PPV 96,9% (83,8-99,9%)

NPV 100,0% (96,9-100,0%)

C. Cross-Reattività

E' stata valutata la cross-reattività di Legionella Pneumophila Card Plus Mascia Brunelli; non c'è cross-reazione con patogeni occasionalmente presenti nelle urine: *Streptococcus pneumoniae*.

D. Riproducibilità

Sono stati eseguiti studi di valutazione per determinare la riproducibilità del Legionella Pneumophila Card Plus Mascia Brunelli, compresi gli studi inter-giornalieri, inter-laboratorio, inter e intra lotto, dimostrando un'elevata riproducibilità in tutti i casi.

13 – LIMITI DEL METODO

- Legionella Pneumophila Card Plus deve essere utilizzato solo su campioni urinari umani. L'uso di altri tipi di campioni (esempio plasma, siero o altri fluidi biologici o campioni ambientali (acqua)) non è stato valutato.
- Un risultato positivo determina la presenza di *L. pneumophila* sierogruppo 1 nei campioni di urina. Un risultato positivo deve essere confermato da ulteriori tecniche di laboratorio (coltura o sierologia). La conferma dell'infezione deve essere fatta da un medico solo dopo aver valutato tutti i risultati clinici e di laboratorio e deve basarsi sulla correlazione dei risultati con ulteriori osservazioni cliniche.
- Un risultato negativo non è significativo perché è possibile che la concentrazione di antigeni nel campione di urina sia inferiore al valore limite di rilevazione. Se i sintomi persistono, è necessario eseguire una determinazione di *L. pneumophila* sierogruppo 1 su un campione proveniente da una coltura.
- L'escrezione dell'antigene di *Legionella* in urina può variare in ciascun paziente. L'escrezione dell'antigene può cominciare dai 3 giorni dopo l'inizio dei sintomi e persistere fino a 1 anno. Un risultato positivo del test Legionella Pneumophila Card Plus può essere dovuto ad una infezione in corso o passata e quindi una diagnosi di infezione non può essere fatta senza ulteriori conferme.
- Sebbene il test sia compatibile con l'acido bórico, la sua presenza aumenta la reattività e potrebbe dare luogo a risultati falsi positivi, pertanto se ne sconsiglia l'uso come conservante.
- Le prestazioni di Legionella Pneumophila Card Plus Mascia Brunelli su urina dopo trattamento con diuretici non è stata valutata. La Legionella Pneumophila Card Plus Mascia Brunelli è stata valutata solo su pazienti ospedalizzati. Una popolazione di pazienti esterni non è stata esaminata.

14 – BIBLIOGRAFIA

1. Roig, J., X. Aquiler, J. Ruiz, et. al. Comparative study of Legionella pneumophila and other nosocomial-acquired pneumoniae. Chest. 1991;99:344-50.
2. Berdal, B.P., C.E. Farshy, and J.C. Feeley. Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. J. Clin. Microbiol. 1979;9:575-578.
3. White A., et al. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease. Trans Am Clin. Climatol. Assoc. 1982;93:50-62
4. Bibb, W.F., P.M. Arnow, L. Thacker, and R.M. McKinney. Detection of soluble Legionella pneumophila antigens in serum and urine specimens by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 1984;20:478-482.
5. Tang, P.W., and S. Toma. Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Legionella soluble antigens. J. Clin. Microbiol. 1986;24:556-558.
6. 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.
7. E.Piccoli, S. Barnini, B. Fabiani, M. Campa. Confronto tra test rapidi per la diagnosi microbiologica di Legionellosi. SIM 2013

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (EXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Identificatore dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'uso (IFU) - Revisione 7	Aggiornamento del contenuto e del layout	2023/03

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

