

Legionella Urine Antigen EIA

Analisi immunoenzimatica per la determinazione in vitro dell'antigene urinario della legionella.

Confezionamento

[REF] ³ 807 600 96 test [IVD] confezione completa

Finalità d'uso

La causa della malattia dei legionari, una patologia respiratoria acuta, è l'infezione da Legionella pneumophila. Può avere un decorso simile ad una leggera influenza (chiamata febbre di Pontiac) o può evolversi in polmonite, che se non trattata, può avere un tasso di letalità relativamente elevato. (1) Il tasso di mortalità, che nel caso di soggetti immunocompetenti può raggiungere il 20% senza trattamento adeguato, può essere ridotto adottando un'adeguata terapia antimicrobica ad uno stadio precoce a seguito di una rapida diagnosi. Nelle infezioni dell'uomo, la specie Legionella pneumophila è quella più frequentemente determinata (80-85%), ma esistono altre specie di legionella più rare che possono essere causa della polmonite. Diverse specie di legionella isolate in pazienti appartengono principalmente al sierogruppo 1, tuttavia esistono altri 14 sierogruppi (2).

Dal 1979, la determinazione dell'antigene specifico nelle urine è stata descritta come test semplice ed affidabile (3,4)

Principio del metodo

Le strip vengono preparate (coating) per micropiastra con anticorpi policlonali di coniglio, che reagiscono con l'antigene della Legionella pneumophila di tutti i sierogruppi e con tutte le altre specie di legionella. L'urina del paziente viene aggiunta ai pozzetti della micropiastra ed ogni antigene di legionella si legherà con l'anticorpo specifico in fase solida. Dopo la prima incubazione, i pozzetti vengono lavati e viene aggiunto un anticorpo perossidasi-marcato che reagisce con l'antigene della Legionella pneumophila, che durante una seconda incubazione si lega ai tre siti di legame liberi. Dopo un ulteriore lavaggio, la presenza del legame di perossidasi viene dimostrata mediante reazione colorata su substrato. La reazione viene interrotta mediante aggiunta di acido solforico e la densità ottica (OD) viene misurata mediante spettrofotometro a 450 nm con lunghezza d'onda di riferimento di 615-690 nm.

Contenuto del kit

[MTP]	1	Micropiastra 12 singole strip con rispettivamente 8 pozzetti rivestiti con IgG anti-legionella di coniglio (concentrazione: > 0.5 µg/ml) compreso frame [MTP].
[NC]	2 x 1,5 ml	Controllo negativo/Calibratore Urine umane, negative per l'antigene della legionella pronte all'uso, umane, autoclavate) Conservante: 0.095% sodio azide
[PC]	1,5 ml	Controllo positivo Antigene di Legionella pneumophila (pronto all'uso) Conservante: 0.095% sodio azide (surnatante della coltura)
[CONJ]	15 ml	Anticorpi anti-legionella di coniglio marcati con perossidasi di rafano (HRP) in tampone tris con stabilizzante proteico Conservante: 0.05% Proclin-300®
[WB]	6 ml	Tampone di lavaggio concentrato (500 x) 0,08 M tampone fosfato pH 7,2 Conservante: 0.01% 2-bromo-2-nitro-1.3-propandiole
[SUB]	2 x 11 ml	Soluzione substrato (pronta all'uso) 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) soluzione < 0,05 % in H ₂ O. Vedere le avvertenze e precauzioni.
[STOP]	15 ml	Soluzione bloccante (pronta all'uso) acido solforico < 1N H ₂ SO ₄
[SB]	1	Sacchetto per conservazione Sacchetto in polietilene per la conservazione delle strip per micropiastra residue.
[i]	1	Foglietto illustrativo

Conservante: concentrazione totale < 0,2%.

Materiale necessario, ma non fornito

Micropipette, spettrofotometro (450 nm, lunghezza d'onda di riferimento 615 - 690 nm), sistema di lavaggio micropiastra (con lavaggio del fondo), incubatrice (37°C) per [MTP].

Avvertenze e precauzioni

Non ingerire i reagenti. Evitare il contatto con la cute e con gli occhi. Tutti i campioni e i materiali utilizzati per l'analisi devono essere trattati come potenzialmente infetti, adottando adeguate precauzioni di sicurezza. Le urine di controllo sono state autoclavate e sterilizzate mediante filtraggio, tuttavia devono essere trattate come potenzialmente infette. Non pipettare con la bocca. Adottare idonee pratiche di laboratorio, indossando guanti, indumenti da laboratorio ed occhiali di protezione. I liquidi e i materiali non combustibili devono essere decontaminati con ipoclorito di sodio (concentrazione finale: 3%, con tempo di attività di almeno 30 minuti). I rifiuti liquidi che contengono acidi devono essere neutralizzati prima di essere eliminati. Le [MTP] e tutti i materiali da riutilizzare devono essere autoclavati per 1 ora a 121°C. Il [SUB] è sensibile alla luce ed è quindi necessario proteggerlo dalla luce stessa. Il test deve essere eseguito da tecnici di laboratorio autorizzati ed adeguatamente addestrati. La procedura richiede condizioni asettiche e microbiologicamente controllate. Se il kit originale è danneggiato informare il produttore.

Conservazione

I reagenti restano stabili fino alla data di scadenza indicata su ciascuna singola etichetta, a condizione che gli stessi siano conservati ad una temperatura di 28°C. Dopo l'apertura, i reagenti devono essere utilizzati entro 30 giorni. In caso di test ripetuti, avere cura di conservare i reagenti subito dopo l'utilizzo, ad una temperatura di 2-8°C. La [MTP] è sigillata in un involucro di alluminio contenente essiccante e deve essere aperta solo una volta raggiunta la temperatura ambiente. Riporre le strip non utilizzate insieme all'essiccante nella busta con chiusura a zip e conservare come indicato a 2-8°C. Non toccare il bordo superiore o il fondo dei pozzetti con le dita.

Procedura di lavaggio

La procedura di lavaggio ha un'importanza primaria. Un lavaggio insufficiente potrebbe compromettere la precisione e causare reazioni aspecifiche. **W1:** lavare 5 volte con soluzione tampone di lavaggio. Rimuovere il liquido nel pozzetto ed erogare 300µl di soluzione tampone di lavaggio. Riempire il pozzetto con almeno 250µl di soluzione tampone di lavaggio (volume complessivo 550µl). Ripetere la procedura di lavaggio 5 volte. A lavaggio terminato, picchiettare sulla piastra. Non lasciare che la piastra si secchi.

Preparazione dei reagenti

Diluire il tampone di lavaggio con acqua demineralizzata o deionizzata (1:501, p.e. 1 ml più 500 ml). La soluzione tampone così preparata rimane stabile per 1 settimana, a condizione che sia conservata a 28°C. Qualora dopo conservazione a 2-8°C dovesse presentarsi cristallizzazione, il tampone di lavaggio può essere riportato allo stadio di soluzione, riscaldando a 37°C. Miscelare attentamente il tampone prima della diluizione. Il tampone di lavaggio e la diluizione possono essere conservati per una settimana a temperatura ambiente (18-25°C). Tutti gli altri componenti per il test vengono preparati in modo da essere pronti per l'uso.

Preparazione dei campioni

I campioni di urina possono essere raccolti in contenitori sterili standard, conservati a temperatura ambiente ed analizzati entro 24 ore. In alternativa, i campioni possono essere conservati a 28°C per 14 giorni o congelati a -20°C. Se i campioni di urina dovessero contenere particelle di grandi dimensioni, dovrà essere utilizzato il surnatante pulito. I campioni di urina congelata contenenti alte percentuali di sali (fosfati, urati) possono provocare precipitazione di ingenti quantità di sali quando vengono scongelati. Dopo miscelazione e sedimentazione può essere utilizzato il surnatante pulito o possono essere utilizzati i cristalli ridissolti mediante riscaldamento a 37°C.

Performance

Il protocollo (vedi procedure di pipettamento) deve essere seguito scrupolosamente.

Utilizzare 100 µl di controllo positivo, controllo negativo e campione per ogni pozzetto. Le strip non sono sigillate con un nastro autoadesivo.

Procedura di pipettamento e performance del test

Scaldare tutti i reagenti a temperatura ambiente prima di utilizzarli.					
I controlli e il bianco devono essere pipettati per ultimi. Dopo aver pipettato i controlli ed i campioni incubare immediatamente la piastra.					
	fase 1	pozzetto [µl]			
		A1	B1/ C1	D1	E1...
	Bianco	--			
	[NC] doppio test	--	100 [NC]	--	--
	[PC]	--	--	100 [PC]	--
	Campione	--	--	--	100
	[MTP]	Incubazione: 60 ± 2 min. , 37 ± 1°C			Processore*: 60 ± 2 min. , 37 ± 1°C
	lavaggio 5x (v. W1)				
	[WB]	550	550	550	550
	fase 2	pozzetto [µl]			
	[CONJ]	100	100	100	100
	[MTP]	Incubazione: 60 ± 2 min. , 37 ± 1°C			Processore*: 60 ± 2 min. , 37 ± 1°C
	lavaggio 5x (v. W1)				
	[WB]	550	550	550	550
	fase 3	pozzetto [µl]			
	[SUB]	100	100	100	100
	Incubazione: 10 ± 1 min.	Processore*: 10 ± 1 min.			
	a temperatura ambiente al buio	a temperatura ambiente al buio			
	[STOP]	100	100	100	100
	Misurare immediatamente l'estinzione o entro 1 minuto dall'aggiunta del bloccante a 450 nm utilizzando uno spettrofotometro (lunghezza d'onda di riferimento: 615-690 nm).				

* Se si utilizza un sistema ELISA è responsabilità dell'operatore convalidare il test.

Controllo qualità

Il controllo negativo e quello positivo devono essere compresi in ogni esecuzione dei test di valutazione del campione del paziente. Campioni di urina di cui si conosca con certezza la positività o la negatività possono essere inclusi come controlli aggiuntivi. Il valore medio dei controlli negativi (bianco sottratto) devono essere inferiori a 0,100. Il valore OD del controllo positivo deve essere superiore a 0,600. Se questi requisiti non corrispondono, i risultati del test non saranno validi e dovrà essere ripetuto.

Calcolo del valore di cut-off

Il valore di cut-off viene calcolato dal valore medio OD (densità ottica) del controllo negativo (NCx) più 0,200. Valore di cut-off = NCx+0,200 Esempio: NCx=0,023, cut-off = 0,023 + 0,200 = 0,223

L'area grigia è localizzata : OD ≥ OD medio di NC + 0,100 e OD < OD medio di NC + 0,200

Esempio: NKx = 0,023, zona grigia = 0,123 – 0,223.

Interpretazione dei risultati

I campioni con un valore di estinzione al di sotto del cut-off sono da considerarsi negativi. **Nota:** un risultato negativo non esclude la possibilità di un'infezione da legionella. Campioni di urina con un'estinzione uguale o superiore al cut-off sono considerati positivi in relazione alla determinazione dell'antigene della legionella. Possono essere rianalizzati campioni positivi, per la conferma. Campioni debolmente positivi nell'ambito di +0,200 devono essere ripetuti per la conferma. Se il campione riprocessato è nuovamente superiore al cut-off il campione dovrà essere considerato positivo. Campioni di urina con un'estensione entro la zona grigia devono essere ritestati. Se il valore OD si troverà nuovamente nella zona grigia, il campione dovrà essere considerato positivo. se il valore OD del campione sarà al disotto della zona grigia il campione dovrà essere considerato negativo.

Interpretazione diagnostica

Risultati superiori al cut-off o ripetutamente entro la zona grigia = positivo: presumibilmente positivo per antigene urinario della legionella. Ciò indica un'infezione da legionella in atto o pregressa (campioni debolmente positivi devono essere ripetuti per la conferma, vedi sopra).

Risultato < NCx + 0,200 = negativo: presumibilmente negativo per l'antigene della legionella nelle urine. La possibilità di un'infezione da legionella non può essere esclusa, in quanto il test non è sufficientemente sensibile per il riconoscimento assoluto di tutti i casi di tutte le specie di legionella. La secrezione dell'antigene può essere differente. Dovranno essere testati campioni del follow-up.

Limiti del metodo

Questo test è stato convalidato utilizzando campioni di urine. Altri materiali (p.e. plasma, siero o liquidi organici) che possono contenere l'antigene della legionella non sono stati testati. Nonostante l'ampia reattività con diverse specie di legionella, Biotest Legionella Urine Antigen EIA non è in grado di determinare con la stessa sensibilità tutte le 39 specie di legionella (6,7). La diagnosi di legionellosi non può basarsi esclusivamente sull'evidenza clinica o radiologica. La determinazione dell'antigene, i risultati di colture ed i test sierologici offrono ulteriore supporto nella diagnosi oltre alle determinazioni cliniche.

La secrezione dell'antigene della legionella nelle urine può variare in base al paziente, alle malattie concomitanti ed al trattamento. Inoltre, la secrezione può essere variabile nello stesso paziente nel tempo, rendendo pertanto necessaria l'esecuzione di una sequenza di test sui campioni di urina. Un trattamento precoce con antibiotici appropriati può ridurre la secrezione dell'antigene in alcuni pazienti. a secrezione dell'antigene, in alcuni pazienti, può persistere per lungo tempo.

Senza tener conto della sensibilità e della specificità del test, occorre considerare che la determinazione dell'antigene deve essere messa in correlazione con i sintomi clinici. Il collegare sintomi clinici con un test positivo per l'antigene può costituire un indicatore precoce.

Performance

Sono stati analizzati 300 campioni di urine di pazienti sani e 176 di soggetti con sospetta infezione del tratto urinario. 475 campioni si sono rivelati negativi al test dell'antigene urinario della legionella. Uno dei soggetti con sospetta infezione del tratto urinario si è evidenziato debolmente positivo. (specificità = 99,78%).

Distribuzione dei valori di estinzione di campioni negativi				
Assorbanza	0.001-0.099	0.100-0.199	0.200-0.299	cut-off
Numero di campioni (totale 476)	449	26	1	0.225

Sono stati analizzati 46 campioni di urine di pazienti affetti da legionella, confermati per mezzo di coltura, utilizzando il test Biotest Legionella Urine EIA. Tutti i 46 campioni hanno prodotto risultato positivo. La tabella sottostante indica la distribuzione dei valori di assorbanza dei 46 campioni.

Distribuzione dei valori di estinzione di campioni positivi (coltura positiva)						
Assorbanza	0.001-0.199	0.200-0.499	0.500-0.999	1.000-1.999	>2.000	cut-off
Numero di campioni (totale 46)	0	0	1	2	43	0.225

Specificità di Biotest Legionella Urine Antigen EIA: 99.8%
Sensibilità di Biotest Legionella Urine Antigen EIA: 100.0%

Nota: si prevede che la sensibilità assoluta di Biotest Legionella Urine Antigen EIA in pazienti affetti da legionellosi definita è del 50-70% (CDC Publication (8) indica il 55,9% con test comparabili).

L'European Multicenter Study of the European Working Group on Legionella Infections EWGLI (5) ha evidenziato una sensibilità del 94,6% per il sierogruppo 1 di Legionella pneumophila ed una sensibilità del 86% comprendendo campioni dei sierogruppi 2, 3, 4, 6, 10.

Bibliografia

1. Frazer, D.W. et al. (1977). N. Engl. J. Med. 297, 1189-1197.
2. Robert Koch Institut (1996). Epidemiologisches Bulletin 35.
3. Edelstein, P.H. et al. (1993). Legionnaires' disease – state-of-the-art clinical article. Clin. Infect. Dis. 16, 741-749.
4. Tang, P.W. et al. (1986). Broad-Spectrum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Legionella Soluble Antigens. J. Clin. Microbiol. 24, 556-558.
5. Harrison, T. et al. (1998). A multicenter evaluation of the Biotest Legionella urinary antigen EIA. Clin. Microbiol. Infect. 4, 359-365.
6. Okada, C. et al. (2002). Cross-Reactivity and Sensitivity of Two Legionella Urinary Antigen Kits, Biotest EIA and Binax NOW, to Extracted Antigens from Various Serogroups of L. pneumophila and Other Legionella Species. Microbiol. Immunol. 46, 51-54.
7. Horn, J. et al. (2002). Comparison of non-serogroup 1 detection by Biotest and Binax Legionella urinary antigen enzyme immunoassays. In: Marre, R. et al. (eds.). Legionella, ASM Press, 207-210.
8. Plouffe, J.F. et al. (1995). Clin. Infect. Dis. 20, 1286-1291.
9. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.

Guida per la risoluzione di problemi

- 1) Valore NC maggiore rispetto al criterio di validità > 0,100 OD:
 - a) [SUB] ha assunto colorazione blu a causa di ossidazione o contaminazione.
 - b) Errore lavaggio: eseguire la fase di 5 cicli di lavaggio. Se si utilizza un dispositivo di lavaggio manuale, eseguire una fase di 7 cicli di lavaggio. Utilizzare Biotest [WB] se contenuto nel kit.
 - c) Errore durante l'incubazione: temperatura troppo elevata, il tempo di incubazione è stato superato o la piastra non è stata incubata direttamente dopo il pipettamento.
 - d) Errore di lunghezza d'onda: la misurazione senza un filtro di riferimento determina un aumento dei valori OD di circa +0,120 OD.
- 2) Colorazione gialla in tutti i pozzetti:
 - a) Contaminazione [WB]; preparare una nuova soluzione tampone di lavaggio
 - b) Contaminazione [CONJ]; ripetere il test con reagenti provenienti da fiale sigillate. Utilizzare i reagenti in condizioni di ridotta presenza microbica.
- 3) Valore medio [PC] inferiore a < 0,800 OD:
 - a) Superamento della data di scadenza.
 - b) Temperatura troppo bassa o scesa durante l'incubazione.
 - c) Errore lavaggio: lavaggio troppo intensivo o contatto meccanico del collettore e della fase solida del pozzetto.
 - d) Contaminazione [PC] o 2b.

