

NADAL[®] Legionella/S. pneumoniae Test (test cassette)

REF 572005



| | | | |
|--------------------------------------|----|------------------------------------|----|
| DE Gebrauchsanweisung | 2 | PL Sposób użycia | 21 |
| EN Instructions for use | 6 | PT Instruções de Utilização | 25 |
| FR Instructions d'utilisation | 9 | Symbols | 31 |
| ES Instrucciones de uso | 13 | Our Teams | 32 |
| IT Istruzioni per l'uso | 17 | | |



1. Verwendungszweck oder Anwendungsbereich

Der NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test ist ein schneller chromatographischer Test im Lateral-Flow-Format zum qualitativen Nachweis von *Legionella pneumophila*- und *Streptococcus pneumoniae*-Antigenen in humanem Urin. Der Test ist für den Gebrauch als Hilfsmittel in der Diagnose einer *Legionella*-Infektion (Legionärskrankheit), Pneumonie, Meningitis und Otitis bestimmt.

2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

Legionella sind gramnegative Bakterien, welche mit dem Pontiac-Fieber und der Legionärskrankheit in Verbindung gebracht werden und welche zu einer Infektion der oberen Atemwege führen und eine Lungenerkrankung (Pneumonie) verursachen können. In vielen Fällen wurde von hohem Fieber berichtet. (1) Geschätzte 10.000 bis 25.000 Fälle mit *Legionella pneumophila*-Infektionen treten jährlich in den USA auf. (2, 3) Ca. 5% bis 30% der Personen mit Legionärskrankheit sterben an den Folgen. Extrapulmonäre Infektionen können durch den Blutkreislauf oder das Lymphsystem verbreitet werden und befallen dabei Herz, Gehirn, Nieren, Leber und/oder Milz. Die üblichen Methoden zum Nachweis von *L. pneumophila* schließen Bakterienkulturen, direkte Fluoreszenz-Antikörper-Untersuchungen, indirekte Fluoreszenz-Antikörper-Untersuchungen, Enzymimmunoassays und Polymerase-Kettenreaktionen ein. (5, 6) *Streptococcus pneumoniae* ist ein grampositives Bakterium, welches erstmals im Jahr 1881 aus dem Speichel eines Patienten mit Tollwut von Pasteur isoliert wurde. (7) Die chemische Struktur und Antigenität des Pneumokokken-Kapselpolysaccharids sowie seine Verbindung zu Virulenz und seine Rolle in menschlichen Krankheiten wurden in der Zeitspanne von 1915 bis 1945 erklärt. Die Bakterien sind lanzettenförmige anaerobe Organismen, die durch engen Kontakt von Mensch zu Mensch über respiratorische Tröpfchen übertragen werden und bei Menschen schwere Erkrankungen verursachen: die 10 häufigsten Serotypen sind Schätzungen zufolge für etwa 62% invasiver Erkrankungen weltweit verantwortlich. (8) *Streptococcus pneumoniae* besiedelt das Gewebe der oberen Atemwege und verursacht eine schwere Lungenentzündung und milde/ akute Ohrenscherzen/ Otitis. (9) Pneumokokken verursachen 13% bis 19% aller Fälle bakterieller Meningitis in den Vereinigten Staaten. (10) Ein Viertel der Patienten mit Pneumokokken-Meningitis hat auch eine Lungenentzündung. Klinische Symptome sind im Allgemeinen denen der purulenten bakteriellen Meningitis ähnlich und schließen Kopfschmerzen, Lethargie, Erbrechen, Reizbarkeit, Fieber, Nackensteifigkeit, kraniale Zeichen, Anfälle und Koma ein. Die Letalitätsrate der Pneumokokkenmeningitis beträgt etwa 30% aber kann bis zu 80% bei älteren Menschen betragen. Für 12-16% der invasiven Pneumokokken-Erkrankungen bei Kindern im Alter von 2 Jahren und jünger sind bakterielle Lungenentzündungen verantwortlich und *S. pneumoniae* ist zur Hauptursache bakterieller Meningitis bei Kindern jünger als 5 Jahre in den Vereinigten Staaten geworden. Eine Antibiotika-Behandlung ist wirksam, auch wenn immer mehr Penicillin-resistente Stämme identifiziert wurden. (11) Mehrere Impfstoffe mit variabler Effizienz abhängig vom Alter des Patienten oder davon, ob der Patient eine chronische Erkrankung oder eine Immundefizienz hat, sind verfügbar.

Nichtsdestotrotz wurde nachgewiesen, dass Impfstoffe vor einer Pneumokokken-Lungenentzündung schützen. (12)

3. Testprinzip

Der NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test besteht aus einem Plastikgehäuse, welches zwei interne Streifen für den Nachweis von *Legionella* und Streptokokken beinhaltet. Mit kolloidalem Gold konjugierte farbige monoklonale *Legionella*- bzw. *Streptococcus*-Antikörper sind im Konjugat-Pad der jeweiligen Membran vorbeschichtet. Ein paar Tropfen der Urinprobe sollten in jede Probenvertiefung (⇔) der Testkassette gegeben werden. Während die Probe die Membrane entlang fließt, bindet das markierte Antikörper-Konjugat das *Legionella*- bzw. *Streptococcus*-Antigen (wenn diese in der Probe vorhanden sind) und dabei entstehen Antikörper-Antigen-Komplexe. Diese Komplexe binden an polyklonale *Legionella*- bzw. *Streptococcus*-Antikörper in den jeweiligen Testlinienbereichen (T) der Testkassette und dabei entsteht jeweils eine rosa-pinke Linie. Sind keine *Legionella*- bzw. *Streptococcus*-Antigene in der Probe vorhanden, entstehen keine Linien in den Testlinienbereichen (T). Das Reaktionsgemisch wandert weiter die Membrane entlang durch die Kontrolllinienbereiche (C). Weitere Antikörper-Konjugate binden die Reagenzien in den Kontrolllinienbereichen (C), dabei entsteht jeweils eine rosa-pinke Linie. Eine Kontrolllinie sollte immer in jedem Kontrolllinienbereich (C) erscheinen unabhängig von der An- oder Abwesenheit der Testlinien und weist darauf hin, dass genügend Probenvolumen hinzugegeben wurde und dass die Membran ausreichend durchnässt ist

4. Bestandteile der Testpackung

- 10 NADAL® Legionella/S. pneumoniae Testkassetten (inkl. Einwegpipetten)
- 1 Gebrauchsanweisung

5. Zusätzlich benötigte Materialien

- Timer
- Probensammelbehälter

6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Der Test sollte im verschlossenen Folienbeutel bei 4-30°C aufbewahrt werden. Frieren Sie das Testkit nicht ein. Der Test ist stabil bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum.

7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für den professionellen *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch.
- Lesen Sie die ganze Gebrauchsanweisung vor der Testdurchführung sorgfältig durch.
- Das Testkit nicht nach Ablauf der Haltbarkeit verwenden.
- Verwenden Sie nur Urinproben.
- Tests nicht wiederverwenden.
- Test nicht verwenden, wenn der Folienbeutel beschädigt ist.
- Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in dem Bereich, in dem mit Proben und Testkits umgegangen wird.
- Behandeln Sie alle Proben so, als ob sie infektiöse Reagenzien enthielten.

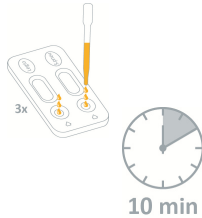
- Beachten Sie bestehende Vorsichtsmaßnahmen für mikrobiologische Risiken während aller Verfahren sowie Standardrichtlinien für die korrekte Probenentsorgung.
- Tragen Sie beim Umgang mit Proben Schutzkleidung wie Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille.
- Benutzte Testmaterialien sollten gemäß lokalen Vorgaben entsorgt werden.
- Feuchtigkeit und Temperaturen können Testergebnisse beeinträchtigen.

8. Probennahme, -vorbereitung und -lagerung

Sammeln Sie eine Urinprobe in einem sauberen Behälter, der frei von Reinigungsmitteln ist. Für bessere Ergebnisse wird der erste Morgenurin bevorzugt, da diese Probe eine höhere Bakterienkonzentration enthalten kann. Wenn die Testung nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die Probe gekühlt (2-8°C) bis zu 24 Stunden aufbewahrt werden. In solchen Fällen bringen Sie die Probe vor der Testung auf Raumtemperatur. Wenn die Testung um mehr als 24 Stunden verschoben wird, sollte die Probe eingefroren werden. Die eingefrorene Probe muss vor der Testdurchführung vollständig aufgetaut, gut durchgemischt und auf Raumtemperatur gebracht werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

9. Testdurchführung

1. Bringen Sie alle Bestandteile des Tests und Proben vor der Testung auf Raumtemperatur.
2. Entnehmen Sie die Testkassette dem Folienbeutel.
3. Kennzeichnen Sie die Testkassette mit dem Patientennamen oder der Kontrollnummer.
4. Füllen Sie eine Pipette mit Urin. Halten Sie sie senkrecht und geben Sie jeweils 3 Tropfen Urin in jede Probenvertiefung (⇒).
5. Werten Sie die Testergebnisse nach 10 Minuten aus. Lesen Sie die Ergebnisse nicht nach mehr als 15 Minuten ab.



10. Testauswertung

Positiv für Legionella pneumophila:

Es erscheint jeweils eine farbige Linie in den Kontrolllinienbereichen (C) und eine farbige Linie im Testlinienbereich (T) für *Legionella pneumophila* (LEGIO).

Positiv für Streptococcus pneumoniae:

Es erscheint jeweils eine farbige Linie in den Kontrolllinienbereichen (C) und eine farbige Linie im Testlinienbereich (T) für *Streptococcus pneumoniae* (S.PNEU).

Positiv für Legionella pneumophila und Streptococcus pneumoniae:

Zusätzlich zu den Kontrolllinien (C) erscheint jeweils eine rote/rosa Linie in den Testlinienbereichen (T) für *Legionella pneumophila* (LEGIO) und *Streptococcus pneumoniae* (S.PNEU).



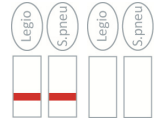
Negativ

Es erscheint jeweils eine farbige Linie in den Kontrolllinienbereichen (C). Keine Linie erscheint in den Testlinienbereichen (T).



Ungültig

Die Kontrolllinien erscheinen nicht. Ergebnisse von den Tests, die nach der festgelegten Auswertzeit keine Kontrolllinien gebildet haben, müssen verworfen werden.



Ungenügendes Probenvolumen, abgelaufene Tests oder fehlerhafte Vorgehensweise sind die wahrscheinlichsten Ursachen dafür, dass die Kontrolllinie nicht erscheint. Verfahrensablauf überprüfen und den Test mit einer neuen Testkassette durchführen. Falls das Problem weiterbesteht, das Testkit ab sofort nicht weiterverwenden und sich mit Ihrem Distributor in Verbindung setzen.

11. Qualitätskontrolle

Die Testkassette beinhaltet eine interne Verfahrenskontrolle:

Eine im Kontrolllinienbereich (C) erscheinende farbige Linie wird als interne Verfahrenskontrolle betrachtet. Sie bestätigt ausreichendes Probenvolumen, eine korrekte Verfahrenstechnik und dass die Membran ausreichend durchnässt ist.

12. Grenzen des Tests

- Der NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test ist für den Nachweis von *Legionella*- und Streptokokken-Antigenen in humanen Urinproben ausgelegt. Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Infektion mit *Legionella pneumophila* nicht aus. Die Antigenkonzentration kann unterhalb der Nachweisgrenze sinken. Es empfiehlt sich, Bakterienkulturen für Patienten mit Verdacht auf Pneumonie zu verwenden, um die Anwesenheit anderer Erreger als *Legionella pneumophila* nachzuweisen.
- Beim Verdacht auf ein falsch positives Ergebnis (d. h. ein positives Ergebnis ohne klinische Anzeichen der Krankheit) muss der Test mit derselben Urinprobe wiederholt werden, nachdem die Urinprobe 5 Minuten bei 100°C erhitzt wurde, um Urinproteine zu denaturieren, ohne dass dabei *Legionella*-Antigene beeinträchtigt werden.
- Falsch positive Ergebnisse können bei Patienten vorkommen, die mit einer anti-Lymphozyten-Antikörper enthaltende Kaninchen-Serum-Injektion behandelt wurden. Anti-Lymphozyten-Antikörper können durch Erhitzung der Urinprobe eliminiert werden, ohne dass dabei *Legionella*-Antigene beeinträchtigt werden (wie im vorigen Punkt beschrieben wird).
- Der Test liefert eine Verdachtsdiagnose einer *Legionella pneumophila*-Infektion. Jedoch sollte dieser Befund nicht ausschließlich auf einem klinischen oder radiologischen Nachweis beruhen. Um eine präzise Diagnose der *Legionella pneumophila*-Infektion zu stellen, sollten Ergebnisse von Bakterienkulturen, serologische Testungen, Antigen-nachweis-Methoden in Verbindung mit klinischen Befunden verwendet werden.

- Sensitive Immunoassays können positive Ergebnisse mit Proben, die heterophile Antikörper enthalten, aufweisen. Sollte die qualitative Interpretation im Widerspruch zu klinischen Befunden stehen, sollten weitere Testungen mit einer alternativen Methode durchgeführt werden.
- Die Legionella-Antigen-Ekretion kann bereits drei Tage nach dem Auftreten von Symptomen beobachtet werden. Jedoch können die Antigene weiterhin bis zu ca. einem Jahr später ausgeschieden werden. Ein positives Ergebnis mit dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test kann während einer aktuellen oder vergangenen Infektion auftreten.
- Der NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test unterscheidet nicht zwischen kolonisierten oder infizierten Personen.
- Der NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test kann nicht zwischen verschiedenen Pneumokokken-Infektionen, die potenziell durch Streptococcus pneumoniae verursacht wurden, unterscheiden. Daher sollten Ergebnisse von Bakterienkulturen, serologischen Testungen, Antigen-nachweis-Methoden in Verbindung mit klinischen Befunden verwendet werden, um eine präzise Diagnose der Legionella pneumophila-Infektion zu stellen.
- Wie bei allen diagnostischen Verfahren sollte der Arzt alle mit dem Test erhaltenen Daten in Verbindung mit weiteren klinischen Informationen evaluieren.

Andere Bakterienstämme als die der Gattung Legionella wurden auf eine Anwendungskonzentration von 3×10^5 CFU/mL in einer Salzlösung vorbereitet und mit dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test getestet. Keiner der unten aufgelisteten Organismen hat mit dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test kreuzreagiert.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Prateus valgaris</i> |
| <i>Pseudomonas seruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |

c) Intra-Assay-Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurde durch eine Testung von 10 Replikaten von 4 Probenverdünnungen unterschiedlicher Legionella-Konzentrationen evaluiert. Alle Reihen haben konvergierende und erwartete Ergebnisse gezeigt. Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit des NADAL® Legionella/S. pneumoniae Tests beträgt 100%.

2. Streptokokken

a) Sensitivität und Spezifität

Eine Vergleichsstudie zwischen dem BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae Schnelltest und dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test wurde unter Verwendung eines Panels von 16 frischen Urinproben und 42 gelagerten Urinproben durchgeführt.

Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle dargestellt:

| NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test | | BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae Schnelltest (Referenzmethode) | | |
|--------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------|----------|--------|
| | | Positive | Negative | Gesamt |
| | | Positiv | 26 | 4 |
| Negativ | 7 | 21 | 28 | |
| Gesamt | 33 | 25 | 58 | |

Aus der obigen Tabelle ergibt sich eine diagnostische Sensitivität des NADAL® Legionella/S. pneumoniae Tests von 79% (26/33) und eine Spezifität von 84% (21/25) im Vergleich zur Referenzmethode. Gesamtübereinstimmung beträgt 81% (47/58) und ist mit dem Hintergrund zufriedenstellend, dass die langfristige Lagerung von 42 Proben (33 positive und 9 negative) eine Zersetzung von Streptococcus pneumoniae-Antigenen hätte verursachen können.

b) Kreuzreaktivität

Verschiedene Bakterienstämme wurden mit dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test getestet, um festzustellen, ob sie eine nicht-spezifische Reaktion (Kreuzreaktionen) verursachen können.

13. Leistungsmerkmale des Tests

1. Legionella

a) Sensitivität und Spezifität

Eine Vergleichsstudie zwischen dem BinaxNOW® Legionella Schnelltest und dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test wurde unter Verwendung eines Panels von 48 humanen Urinproben durchgeführt.

Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle dargestellt:

| NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test | | BinaxNOW® Legionella Schnelltest (Referenzmethode) | | |
|--------------------------------------|---|----------------------------------------------------|---------|--------|
| | | Positiv | Negativ | Gesamt |
| | | Positiv | 8 | 0 |
| Negativ | 0 | 40 | 40 | |
| Gesamt | 8 | 40 | 48 | |

Aus der obigen Tabelle ergeben sich eine diagnostische Sensitivität und Spezifität des NADAL® Legionella/S. pneumoniae Tests von jeweils 100% (8/8, 40/40) im Vergleich zur Referenzmethode. Gesamtübereinstimmung beträgt 100% (48/48).

b) Kreuzreaktivität

Die unten aufgelisteten Legionella-Stämme wurden kultiviert und auf eine Anwendungskonzentration von 1×10^5 CFU/mL in einer Salzlösung vorbereitet. Jeder zu testende Stamm wurde mit dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test getestet. Keiner der unten aufgelisteten Organismen hat mit dem NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test kreuzreagiert.

| | |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Legionella pneumophila serogroup 2-14</i> | <i>Legionella anisa</i> |
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Legionella dumaffii</i> |
| <i>Legionella feeleii</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella hackeliae</i> | <i>Legionella micdadei</i> |
| <i>Legionella longbeachae</i> | |

Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle dargestellt:

| Gruppe | Ergebnis |
|------------------------------------------|----------------|
| Strep-Pneumo capsular types (8) | Positiv |
| Strep-A, B, C, D, E, F, G & H | Negativ |
| Staphylococcus Aureus | Negativ |
| Bacillus subtilis | Negativ |

c) Intra-Assay-Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurde durch die Testung von 10 Replikaten von 5 Probenverdünnungen unterschiedlicher *Streptococcus Pneumoniae*-Konzentrationen evaluiert. Alle Reihen haben konvergierende und erwartete Ergebnisse gezeigt. Die Intra-Chargen-Reproduzierbarkeit des NADAL® Legionella/S. pneumoniae Tests beträgt 100%.

14. Referenzen

1. Edelstein, P.H. and Meyer, R.D., 'Legionella Pneumonias' In Respiratory infection: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New-York: Raven Press, Ltd. 1994.
2. Marston, B.J., Lipman, H.B. and Breiman, R.F. Arch. Intern. Med., 154, 2417-2422 (1994).
3. Horwitz, M.A., Marston, B.J., Broone, C.V. and Freiman, R.F. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology (1993).
4. Kohler, R. B. Winn, W.C. Jr and Wheat, L.J. J. Clin. Microbiol., 20, 605-607 (1984).
5. Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Christie, P., Johnston, F. and Edwards, G.F.S. J. Med. Microbiol., 53, 183-187 (2004).
6. Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. J. Clin. Microbiol., 38, 1709-1712.
7. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
8. CDC. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34): 1102-1106, 2010.
9. Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews, Microbiology, 6 (4) doi : 10.1038/nrmicro1871, 2008.
10. Robinson, K.A., Baughman, W., Rothrock, G. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998. Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA, 285: 1729-1735, 2001.
11. Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States. N. Engl. J. Med., 343: 1917-1924, 2000.
12. Tsai, C.J., Griffin, M.R., Nuorti, J.P. et al. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. Clin. Infect. Dis., 46 : 1664-1672, 2008.

Rev. 1, 2017-03-07 OM/UJ

1. Intended Use

The NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test is a lateral flow, rapid immunochromatographic test for the qualitative detection of *Legionella pneumophila* and *Streptococcus pneumoniae* antigens in human urine. The test is intended to be used as an aid in the diagnosis of *Legionella* infection (Legionnaires' disease), pneumonia, meningitis and otitis.

2. Introduction and Clinical Significance

Legionella are gram-negative bacteria associated with Pontiac fever and Legionnaires' disease leading to the infection of the upper respiratory tract and causing the pulmonary disease of pneumonia. In many cases high fever has been reported.(1) An estimated 10,000 to 25,000 cases involving *Legionella pneumophila* infections occur in the USA annually.(2, 3) About 5% to 30% of people with Legionnaires' disease die as a result. Extrapulmonary infections may be spread through the bloodstream or the lymph system infecting the heart, brain, kidney, liver and/or spleen. Common methods for the detection of *Legionella pneumophila* include culture, direct fluorescent antibody testing, indirect fluorescent antibody, enzyme immunoassays and polymerase chain reaction.(5, 6) *Streptococcus pneumoniae* is a gram-positive bacterium first isolated by Pasteur in 1881 from the saliva of a patient with rabies.(7) The chemical structure and antigenicity of the pneumococcal capsular polysaccharide and its association with virulence and role in human disease were explained over the period from 1915 to 1945. Bacteria are lancet-shaped anaerobic organisms which are spread by close person-to-person contact via respiratory droplets and cause serious diseases in humans: The 10 most common serotypes are estimated to account for about 62% of invasive disease worldwide.(8) *Streptococcus pneumoniae* colonizes upper respiratory tract tissues, causing severe pneumonia and mild/acute earache/otitis.(9) Pneumococci cause 13% to 19% of all cases of bacterial meningitis in the United States.(10) One-quarter of patients with pneumococcal meningitis also have pneumonia. The clinical symptoms are generally similar to other forms of purulent bacterial meningitis and include headache, lethargy, vomiting, irritability, fever, nuchal rigidity, cranial signs, seizures and coma. The case-fatality of pneumococcal meningitis is about 30% but can be as high as 80% among the elderly. Bacterial pneumonia accounts for 12-16% of invasive pneumococcal disease among children aged 2 years and younger, and *S. pneumoniae* has become the leading cause of bacterial meningitis among children younger than 5 years old in the United States. Antibiotic treatment is efficient even if more penicillin-resistant strains have been identified.(11) Several vaccines are available, with varying efficiency, depending on patient factors such as age, chronic illnesses or immunodeficiency. Nevertheless, vaccines have been demonstrated to provide protection against pneumococcal pneumonia.(12)

3. Test Principle

The NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test cassette consists of a plastic housing containing two different internal strips for the detection of *Legionella* and *Streptococcus*. Coloured monoclonal *Legionella* and *Streptococcus* antibodies conjugated with colloidal gold are placed in the respective conjugate pad of each membrane. A few drops of urine

sample should be dispensed into each sample well (⇔) of the test cassette. As the test sample flows along the membranes, the labelled antibody-dye conjugate binds to the *Legionella* and *Streptococcus* antigens (when present in the sample) forming antibody-antigen complexes. These complexes bind to the polyclonal *Legionella* or *Streptococcus* antibodies in the test line region (T) of each test cassette, producing a rose-pink line. In the absence of *Legionella* or *Streptococcus*, no lines will appear in the test line regions (T). The reaction mixture continues migrating along the membranes, through the control line regions (C). Further antibody conjugates bind to the reagents in the control line regions (C), producing rose-pink lines. The control line should always appear in each control line region (C) regardless of the presence or absence of the test line, indicating that the proper volume of specimen has been added and membrane wicking has occurred.

4. Reagents and Materials Supplied

- 10 NADAL® Legionella/S. pneumoniae test cassettes (incl. disposable pipettes)
- 1 package insert

5. Additional Materials Required

- Timer
- Specimen collection container

6. Storage & Stability

The test should be stored in the sealed foil pouch at 4-30°C. Do not freeze the test kit. The test is stable until the expiry date stated on the package.

7. Warnings and Precautions

- For professional *in-vitro* diagnostic use only.
- Read the package insert carefully before performing the test.
- Do not use test kits beyond the expiration date.
- Use only urine samples.
- Do not reuse tests.
- Do not use the test if the foil pouch is damaged.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and test kits are handled.
- Handle all specimens as if they contained infectious agents.
- Observe established precautions for microbiological risks throughout all procedures and standard guidelines for the appropriate disposal of specimens.
- Wear protective clothing such as laboratory coats, disposable gloves and eye protection when specimens are being tested.
- Used testing materials should be discarded according to local regulations.
- Humidity and temperature can adversely affect test results.

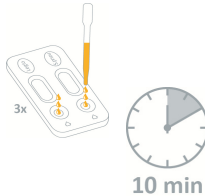
8. Specimen Collection and Preparation

Collect a urine specimen in a clean container which is free of detergent. For optimal results, a first morning urine specimen is preferred, since this sample could contain the highest concentration of bacteria. If testing is not immediate, the specimen should be refrigerated (2-8°C) for up to 24 hours. In such cases, bring the specimen to room temperature prior to testing. If testing is delayed for more than 24 hours, the specimen should be frozen. A frozen specimen must be

completely thawed, thoroughly mixed and brought to room temperature prior to testing. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.

9. Test Procedure

1. Bring all test components and samples to room temperature.
2. Remove the test cassette from the foil pouch.
3. Label the test cassette with the patient's name or control number.
4. Fill a pipette with urine. Holding it vertically, add 3 drops of the urine to each sample well (⇨).
5. Read test results after 10 minutes. Do not interpret test results after more than 15 minutes.



10. Result Interpretation

Positive for *Legionella pneumophila*:

One coloured line develops in each control line region (C) and one coloured line develops in the test line region (T) for *Legionella pneumophila* (LEGIO).



Positive for *Streptococcus pneumoniae*:

One coloured line develops in each control line region (C) and one coloured line develops in the test line region (T) for *Streptococcus pneumoniae* (S.PNEU).



Positive for *Legionella pneumophila* and *Streptococcus pneumoniae*:

In addition to the control lines (C), a red/pink line develops in each test line region for *Legionella pneumophila* and *Streptococcus pneumoniae*.



Negative:

One coloured line appears in the control line region (C). No coloured line appears in the test line region (T).



Invalid:

The control lines fail to appear. Results from any test which has not produced control lines at the specified reading time must be discarded.



Insufficient specimen volume, incorrect operating procedure or expired tests are the most likely reasons for control line failure. Please review the procedure and repeat the test with a new test cassette. If the problem persists, discontinue using the test kit immediately and contact your distributor.

11. Quality Control

An internal procedural control is included in the test cassette:

A coloured line appearing in the control line region is considered an internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume, adequate membrane wicking and correct procedural technique.

12. Limitations

- The NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test is designed to detect *Legionella* and *Streptococcus* antigens in human urine samples. A negative antigen result does not rule out the possibility of infection with *Legionella pneumophila*. The antigen concentration may fall below the detection level of the test. It is recommended that culture be used for patients with suspected pneumonia to detect the presence of causative agents other than *Legionella pneumophila*.
- If a false positive result is suspected (i.e. positive result without any clinical signs of the disease), the test must be repeated on the same urine sample after the urine sample being heated for 5 minutes at 100°C to denature urine proteins without affecting *Legionella* antigens.
- False positive results can be obtained for patients having been treated with injection of anti-lymphocyte rabbit serum. Anti-rabbit antibodies can be eliminated by heating a urine specimen without affecting *Legionella* antigens (as described in the previous point).
- The test provides a presumptive diagnosis of a *Legionella pneumophila* infection. However, this finding should not be based on clinical and radiological evidence alone. In order to make an accurate diagnosis, culture results, serology testing and antigen detection methods should be used in conjunction with clinical findings.
- Sensitive immunoassays may demonstrate positive results with specimens containing heterophilic antibodies. If the qualitative interpretation is inconsistent with clinical findings, further testing with an alternative method should be performed.
- Excretion of *Legionella* antigens may be seen as early as three days after the onset of symptoms. However, antigens may continue to be excreted for up to one year afterwards. A positive result with the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test may occur during a current and past infection.
- The NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test will not differentiate between colonised and infected individuals.
- The NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test cannot distinguish between different pneumococcal infections potentially induced by *Streptococcus pneumoniae*. Therefore, in order to make an accurate diagnosis, culture results, serology testing and antigen detection methods should be used in conjunction with clinical findings.
- As with any other diagnostic procedures, the physician should evaluate data obtained with this test in the light of other clinical information.

13. Performance Characteristics

1. Legionella

a) Sensitivity and specificity

A comparative study between the BinaxNOW® Legionella rapid test and the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test has been performed using a panel of 48 human urine samples.

The results are presented in the following table:

| | | BinaxNOW® Legionella rapid test (reference method) | | |
|------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------------|----------|-------|
| | | Positive | Negative | Total |
| NADAL® Legionella/ S. pneumoniae Test | Positive | 8 | 0 | 8 |
| | Negative | 0 | 40 | 40 |
| | Total | 8 | 40 | 48 |

From the above table, the diagnostic sensitivity of the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test is 100% (8/8) and its specificity is 100% (40/40) when compared to the reference method. Overall agreement is 100% (48/48).

b) Cross reactivity

The *Legionella* strains listed below were cultured and prepared to a working concentration of 1×10^8 CFU/mL in saline. Each test strain was run on the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test. None of the organisms listed below cross-reacted with the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test.

| | |
|-------------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 2-14 | <i>Legionella anisa</i> |
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Legionella dumoffii</i> |
| <i>Legionella feeleii</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella hackeliae</i> | <i>Legionella micdadei</i> |
| <i>Legionella longbeachae</i> | |

Bacteria strains other than those of the genus *Legionella* were prepared at a working concentration of 3×10^8 CFU/mL in saline and run on the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test. None of the organisms listed below cross-reacted with the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus valgaris</i> |
| <i>Pseudomonas seruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |

c) Intra-assay reproducibility

The intra-assay reproducibility was evaluated by running 10 replicates of 4 sample dilutions with differing *Legionella* concentration. All the series showed converging and expected results. Intra-lot reproducibility performance of the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test is 100%.

2. Streptococcus

a) Sensitivity and specificity

A comparative study between BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae rapid test and the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test has been performed using a panel of 16 fresh urine samples and 42 stored urine samples.

The results are presented in the following table:

| | | BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae rapid test (reference method) | | |
|------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------------------------------|----------|-------|
| | | Positive | Negative | Total |
| NADAL® Legionella/ S. pneumoniae Test | Positive | 26 | 4 | 30 |
| | Negative | 7 | 21 | 28 |
| | Total | 33 | 25 | 58 |

From the above table, the diagnostic sensitivity of the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test is 79% (26/33) and its specificity is 84% (21/25) when compared to the reference method. Overall agreement is 81% (47/58) and is satisfactory due to the fact that long storage of the 42 samples (33 positive and 9 negative) could have caused degradation of *Streptococcus pneumoniae* antigens.

b) Cross-reactivity

Different strains of bacteria were tested using the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test in order to determine whether they might cause a non-specific reaction (cross-reactions).

The results are presented in the following table:

| Group | Result |
|---------------------------------|----------|
| Strep-Pneumo capsular types (8) | Positive |
| Strep-A, B, C, D, E, F, G & H | Negative |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> | Negative |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Negative |

c) Intra assay-reproducibility

The intra-assay reproducibility was evaluated by running 10 replicates of 5 sample dilutions having different *Streptococcus Pneumoniae* concentration. All the series showed converging and expected results. Intra-lot reproducibility performance of the NADAL® Legionella/S. pneumoniae Test is 100%.

14. References

- Edelstein, P.H. and Meyer, R.D., 'Legionella Pneumonias' In Respiratory infection: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New-York: Raven Press, Ltd. 1994.
- Marston, B.J., Lipman, H.B. and Breiman, R.F. Arch. Intern. Med., 154, 2417-2422 (1994).
- Horwitz, M.A., Marston, B.J., Broone, C.V. and Freiman, R.F. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology (1993).
- Kohler, R. B. Winn, W.C. Jr and Wheat, L.J. J. Clin. Microbiol., 20, 605-607 (1984).
- Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Christie, P., Johnston, F. and Edwards, G.F.S. J. Med. Microbiol., 53, 183-187 (2004).
- Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. J. Clin. Microbiol., 38, 1709-1712.
- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A.F., Verhoen, J., Snippe, H. Streptococcus pneumoniae : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
- CDC. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34): 1102-1106, 2010.
- Kadioglu, A., Welsler, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews, Microbiology, 6 (4) doi : 10.1038/nrmicro1871, 2008.
- Robinson, K.A., Baughman, W., Rothrock, G. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998. Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA, 285: 1729-1735, 2001.
- Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States. N. Engl. J. Med., 343: 1917-1924, 2000.
- Tsai, C.J., Griffin, M.R., Nuorti, J.P. et al. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. Clin. Infect. Dis., 46 : 1664-1672, 2008.

Rev. 1, 2017-03-07 OM/UJ

1. Domaine d'application

Le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae est un test rapide chromatographique à flux latéral pour la détection qualitative des antigènes *Legionella pneumophila* et *Streptococcus pneumoniae* dans l'urine humaine. Le test est destiné à l'aide au diagnostic de la légionellose, la pneumonie, la méningite et l'otite.

2. Introduction et signification clinique

Legionella sont des bactéries à gram négatif associées à la fièvre de Pontiac et à la maladie du légionnaire qui peuvent mener à une infection des voies respiratoires supérieures et causer une maladie au niveau des poumons (pneumonie). De fortes fièvres sont signalées.(1) Chaque année aux USA, entre 10 000 et 25 000 nouveaux cas d'infections à *Legionella pneumophila* sont recensés.(2, 3) Environ 5 à 30% des individus décèdent des suites de la légionellose. Les infections extra pulmonaires peuvent atteindre la circulation sanguine et le système lymphatique et ainsi coloniser le cœur, le cerveau, les reins, le foie et/ou la rate. Les méthodes habituelles utilisées pour la détection des *Legionella pneumophila* incluent les cultures de bactérie, l'immunofluorescence directe, l'immunofluorescence indirecte, la méthode immunoenzymatique et la réaction en chaîne par polymérase.(5, 6) *Streptococcus pneumoniae* sont des bactéries à gram positif, isolées pour la première fois en 1881 par Pasteur dans la salive d'un patient atteint de la rage.(7) Entre 1915 et 1945, la structure chimique, l'antigénicité, les facteurs de virulence et le rôle dans les pathologies humaines du polysaccharide capsulaire pneumocoque ont été expliqués. Les bactéries sont des organismes lancéolés de type aéronobie. La transmission a lieu par contact direct ou par les gouttelettes respiratoires infectées. Ces bactéries provoquent de graves maladies : selon les estimations, les 10 sérotypes les plus fréquents sont responsables de 62% des maladies invasives mondiales.(8) *Streptococcus pneumoniae* colonisent les tissus des voies respiratoires supérieures provoquant des pneumonies aiguës, de légères/fortes douleurs aux oreilles et des otites.(9) Les pneumocoques provoquent 13 à 19 % de tous les cas de méningite bactérienne aux Etats-Unis.(10) Un quart des personnes atteintes de la méningite à pneumocoque est également touché par une pneumonie. Les symptômes cliniques sont généralement semblables à ceux de la méningite bactérienne purulente : maux de tête, léthargie, vomissements, irritabilité, fièvre, raideur du cou, signes crâniens, convulsions et coma. Le taux de mortalité de la méningite à pneumocoque est de 30 % et peut atteindre 80% chez les personnes âgées. Chez les enfants âgés de 2 ans et moins, 12 à 16 % des infections invasives à pneumocoques sont des pneumonies bactériennes. Aux Etats-Unis, les *S. pneumoniae* sont devenus la cause principale des méningites bactériennes chez les enfants âgés de 5 ans et moins. Le traitement antibiotique est efficace même si de plus en plus de souches résistent à la pénicilline.(11) Plusieurs vaccins sont disponibles. Leur efficacité varie selon l'âge du patient et selon si le patient est atteint d'une maladie chronique ou d'une immunodéficience. Il a toutefois été prouvé que les vaccins protègent de la pneumonie à pneumocoque.(12)

3. Principe du test

Le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae est composé d'une cassette en plastique contenant 2 bandelettes internes pour la détection de *Legionella* et *Streptococcus*. Des anticorps monoclonaux *Legionella* et *Streptococcus* marqués à l'or colloïdal sont immobilisés sur le tampon de conjugué de chacune des membranes. Quelques gouttes du prélèvement d'urine sont déposées dans chaque puits de dépôt (⇨) de la cassette. Pendant que le prélèvement migre le long de la membrane, le conjugué d'anticorps marqué se lie aux antigènes *Legionella* et *Streptococcus* (si ceux-ci sont présents dans le prélèvement). Un complexe anticorps-antigènes se forme. Ce complexe se lie aux anticorps polyclonaux *Legionella* et *Streptococcus* au niveau des zones de test (T) de la cassette. Une ligne rose apparaît. Si les antigènes *Legionella* ou *Streptococcus* ne sont pas détectés dans les prélèvements, aucune ligne de couleur n'apparaît au niveau de la zone de test (T). Le mélange réactionnel continue de migrer sur la membrane jusqu'à la zone de contrôle (C). D'autres conjugués d'anticorps se lient aux réactifs au niveau de la zone de contrôle (C), une ligne rose/rouge apparaît. Une ligne de contrôle doit toujours apparaître à hauteur de la zone de contrôle (C) et ce, indépendamment de la présence ou de l'absence d'une ligne de test (T). Cette ligne de contrôle indique que la quantité de prélèvement déposé était suffisante et que la membrane a été suffisamment imbibée.

4. Matériel fourni

- 10 cassettes NADAL® Legionella/S. pneumoniae (incluant pipettes à usage unique)
- 1 notice d'utilisation

5. Matériel supplémentaire nécessaire

- Chronomètre
- Récipient collecteur

6. Péréemption et conservation des réactifs

Conserver le test dans son emballage fermé à une température comprise entre 4 et 30°C. Ne pas congeler le kit. Le test reste stable jusqu'à la date de péréemption indiquée sur l'emballage.

7. Précautions et mesures de sécurité

- Test uniquement réservé au diagnostic *in-vitro* professionnel.
- Veiller à lire attentivement la notice d'utilisation avant de réaliser le test.
- Ne pas utiliser le coffret au delà de la date de péréemption.
- N'utiliser que des prélèvements d'urine.
- Test à usage unique.
- Ne pas utiliser le test si l'emballage est endommagé.
- Ne pas manger, boire ou fumer à proximité de la zone de manipulation des tests.
- Manipuler les échantillons en les considérant comme de potentiels réactifs infectieux.
- Respecter les précautions relatives aux risques microbiologiques pendant les manipulations ainsi que les directives locales en vigueur concernant l'élimination des déchets.

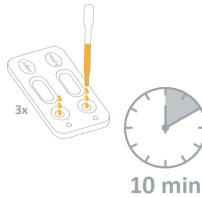
- Utiliser des vêtements de protection tels qu'une blouse de laboratoire, des gants à usage unique et des lunettes de protection.
- Les composants du test doivent être éliminés selon les directives locales en vigueur.
- L'humidité et les températures peuvent avoir une influence sur les résultats du test.

8. Recueil et conservation des échantillons

Recueillir le prélèvement d'urine dans un récipient propre, ne contenant aucune trace de produits de nettoyage. Afin de garantir la précision des résultats, il est recommandé de recueillir la première urine du matin, celle-ci présentant une plus forte concentration en bactéries. Si le test n'est pas réalisé immédiatement, il est conseillé de le conserver en milieu réfrigéré (2-8°C) jusqu'à 24h. Dans ce cas, amener le prélèvement à température ambiante. Si le test est réalisé après 24 heures, congeler les prélèvements. Les prélèvements congelés doivent être complètement décongelés avant la réalisation du test, puis mélangés scrupuleusement et amener à température ambiante. Éviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

9. Exécution du test

1. Amener tous les composants et les prélèvements à température ambiante avant de réaliser le test.
2. Retirer la cassette de l'emballage.
3. Indiquer le nom du patient et le numéro de contrôle sur la cassette.
4. Remplir la pipette d'urine. Tenir la pipette à la verticale et déposer 3 gouttes d'urine dans chaque puits de dépôt de la cassette (⇒).
5. Interpréter le résultat du test au bout de 10 minutes. Ne pas lire les résultats après plus de 15 minutes.



10. Interprétation des résultats

Positif à *Legionella pneumophila*:

Une ligne apparaît au niveau des zones de contrôle (C) et une ligne au niveau de la zone de test (T) pour *Legionella pneumophila* (LEGIO).



Positif à *Streptococcus pneumoniae*:

Une ligne apparaît au niveau des zones de contrôle (C) et une ligne au niveau de la zone de test (T) pour *Streptococcus pneumoniae* (S.PNEU).



Positif à *Legionella pneumophila* et *Streptococcus pneumoniae*:

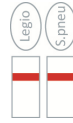
En plus des lignes de contrôle (C), une ligne de test rose/rouge apparaît au niveau de chacune des zones de test (T) *Legionella*



pneumophila (LEGIO) et *Streptococcus pneumoniae* (S.PNEU).

Négatif :

Deux lignes de couleurs apparaissent au niveau des zones de contrôle (C). Aucune ligne n'apparaît au niveau des zones de test (T).



Non-valide :

Les lignes de contrôle n'apparaissent pas. Les tests sur lesquels aucune ligne de contrôle n'est apparue dans le temps d'évaluation fixé doivent être jetés.



Un volume d'échantillon insuffisant, une mauvaise manipulation ou des tests périmés sont les principales causes d'absence de ligne de contrôle. Relire le déroulement de la manipulation et refaire le test. Dans le cas où le problème persiste, ne pas réutiliser le kit et se mettre en contact avec le distributeur.

11. Contrôle qualité

La cassette contient une procédure de contrôle interne.

La ligne rouge apparaissant au niveau de la zone de contrôle (C) est considérée comme une ligne de contrôle interne. Cette ligne confirme que le volume d'échantillon était suffisant, que la manipulation a été correctement effectuée et que la membrane a été suffisamment imbibée.

12. Limites du test

- Le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae est destiné à la détection des antigènes *Legionella* et *Streptococcus* dans les prélèvements d'urine. Un résultat négatif n'exclue pas une infection possible à *Legionella pneumophila*. Il arrive que la concentration en antigènes soit inférieure au seuil de détection du test. Pour les patients chez qui on soupçonne une pneumonie, il est recommandé d'utiliser des cultures de bactéries afin de détecter la présence possible d'autres agents pathogènes que *Legionella pneumophila*.
- Lorsqu'il y a suspicion d'un faux-positif (c'est-à-dire d'un résultat positif sans signes cliniques de la maladie), le test doit être répété avec le prélèvement d'urine après avoir chauffé ce même prélèvement à 100 °C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines de l'urine sans endommager les antigènes *Legionella*.
- Les faux positifs peuvent apparaître chez les patients ayant reçu une injection anti-lymphocytaire à partir de sérum de lapin. Les anticorps anti-lymphocytes peuvent être éliminés en chauffant les prélèvements d'urine, sans endommager les antigènes *Legionella* (comme décrit dans le point précédent).
- Le test fournit un diagnostic lors d'un soupçon d'infection à *Legionella pneumophila*. Cependant, le diagnostic précoce ne devrait pas se baser seulement sur des données cliniques et radiologiques. Afin d'établir un diagnostic précis de l'infection à *Legionella pneumophila*, il est conseillé d'également s'appuyer sur des cultures de bactéries, des analyses sérologiques, des méthodes de détection des antigènes et des données cliniques.

- Les immunodosages sensibles peuvent indiquer des résultats positifs avec les prélèvements qui contiennent des anticorps hétérophiles. Dans le cas où l'interprétation qualitative s'oppose aux données cliniques, réaliser de nouvelles analyses avec des méthodes alternatives.
- L'excrétion des antigènes *Legionella* peut être observée dès 3 jours après l'apparition des symptômes. Cependant, il est possible de détecter les antigènes pendant une durée de un an. Un résultat positif au test NADAL® Legionella/S. pneumoniae peut apparaître pendant l'infection mais également lors d'une infection passée.
- Le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae ne différencie pas les individus colonisés des individus infectés.
- Le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae ne différencie pas les diverses infections pneumocoques, potentiellement causées par *Streptococcus pneumoniae*. C'est pour cette raison que les résultats obtenus par cultures de bactéries, par analyse sérologique, par méthodes de détection des antigènes doivent être utilisés en association avec des données cliniques afin de fournir un diagnostic précis de l'infection à *Legionella pneumophila*.
- Comme avec tous les procédés diagnostiques, il est recommandé au médecin d'interpréter les données obtenues en association avec diverses informations cliniques.

13. Performance du test

1. Legionella

a) Sensibilité et spécificité

Une étude comparative a été menée avec le test rapide BinaxNOW® Legionella et le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae en utilisant 48 prélèvements d'urine humaine.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

| | | Test BinaxNOW® Legionella (méthode de référence) | | |
|---------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------|---------|-------|
| | | Positif | Négatif | Total |
| Test NADAL® Legionella/ S. pneumoniae | Positif | 8 | 0 | 8 |
| | Négatif | 0 | 40 | 40 |
| | Total | 8 | 40 | 48 |

Le tableau ci-dessous indique une sensibilité et une spécificité diagnostique du test NADAL® Legionella/S. pneumoniae de 100 % (8/8, 40/40) en comparaison avec la méthode de référence. La concordance générale est de 100% (48/48).

b) Réactions croisées

Les souches *Legionella* listées ci-dessous ont été cultivées et préparées à une concentration d'utilisation de 1×10^8 CFU/mL dans une solution iodée. Toutes les souches testables ont été analysées avec le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Aucun des organismes listés ci-dessous n'a indiqué de réactions croisées avec le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|------------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2-14 | <i>Legionella anisa</i> |
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Legionella dumoffii</i> |
| <i>Legionella feeleii</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella hackeliae</i> | <i>Legionella micdadei</i> |
| <i>Legionella longbeachae</i> | |

D'autres souches bactériennes du genre *Legionella* ont été préparées à une concentration d'utilisation de 3×10^8 CFU/mL dans une solution iodée et testées avec le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Aucun des organismes listés ci-dessous n'a montré de réactions croisées avec le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus valugaris</i> |
| <i>Pseudomonas seruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |

c) Reproductibilité Intra-Assay

La reproductibilité intra-assay a été évaluée sur 10 reproductions de 4 dilutions de prélèvement à différentes concentrations de *Legionella*. Toutes les lignes ont montré des résultats attendus et convergents. La reproductibilité intra-assay avec le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae est de 100%.

2. Streptocoques

a) Sensibilité et spécificité

Une étude comparative a été menée entre le test BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae et le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae en utilisant un panel de 16 prélèvements d'urine fraîche et 42 prélèvements d'urine conservés.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

| | | Test BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae (méthode de référence) | | |
|---------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------|---------|-------|
| | | Positif | Négatif | Total |
| Test NADAL® Legionella/ S. pneumoniae | Positif | 26 | 4 | 30 |
| | Négatif | 7 | 21 | 28 |
| | Total | 33 | 25 | 58 |

Le tableau ci-dessus indique une sensibilité diagnostique du test NADAL® Legionella/S. pneumoniae de 79% (26/33) et une spécificité de 84% (21/25) en comparaison avec les méthodes de référence. La concordance générale de 81% (47/58) confirme que la longue conservation des 42 prélèvements (33 positifs et 9 négatifs) entraîne une décomposition des antigènes *Streptococcus pneumoniae*.

b) Réactions croisées

Les différentes souches bactériennes susceptibles de causer une réaction non-spécifique (réaction croisée) ont été testées avec le test NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

| Groupe | Résultats |
|------------------------------------------|----------------|
| Strep-Pneumo capsular types (8) | Positif |
| Strep-A, B, C, D, E, F, G & H | Négatif |
| Staphylococcus aureus | Négatif |
| Bacillus subtilis | Négatif |

c) Reproductibilité intra-assay

La reproductibilité intra-assay a été évaluée sur 10 reproductions de 5 dilutions de prélèvement à différentes concentrations de *Streptococcus Pneumoniae*. Toutes les lignes ont montré des résultats attendus et convergents. La reproductibilité intra-charge du test NADAL® Legionella/S. pneumoniae est de 100%

14. Bibliographie

1. Edelstein, P.H. and Meyer, R.D., 'Legionella Pneumonias' in Respiratory infection: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New-York: Raven Press, Ltd. 1994.
2. Marston, B.J., Lipman, H.B. and Breiman, R.F. Arch. Intern. Med., 154, 2417-2422 (1994).
3. Horwitz, M.A., Marston, B.J., Broone, C.V. and Freiman, R.F. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology (1993).
4. Kohler, R. B. Winn, W.C. Jr and Wheat, L.J. J. Clin. Microbiol., 20, 605-607 (1984).
5. Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Christie, P., Johnston, F. and Edwards, G.F.S. J. Med. Microbiol., 53, 183-187 (2004).
6. Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. J. Clin. Microbiol., 38, 1709-1712 .
7. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
8. CDC. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34): 1102-1106, 2010.
9. Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews, Microbiology, 6 (4) doi : 10.1038/nrmicro1871, 2008.
10. Robinson, K.A., Baughman, W., Rothrock, G. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998. Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA, 285: 1729-1735, 2001.
11. Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States. N. Engl. J. Med., 343: 1917-1924, 2000.
12. Tsai, C.J., Griffin, M.R., Nuorti, J.P. et al. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. Clin. Infect. Dis., 46 : 1664-1672, 2008.

Rev. 0, 2016-04-13 PF

1. Uso previsto

El test NADAL® Legionella/S. pneumoniae es un inmunoensayo cromatográfico rápido de flujo lateral para la detección cualitativa de *Legionella pneumophila* y antígenos de *Streptococcus pneumoniae* en orina humana. Este test está diseñado para servir de ayuda en el diagnóstico de la infección de *Legionella* (enfermedad del legionario), neumonía, meningitis y otitis.

2. Introducción y significado clínico

La *Legionella* es una bacteria gram-negativa relacionada con la fiebre de Pontiac y con la enfermedad del legionario, que deriva en la infección del tracto respiratorio superior causando la enfermedad pulmonar (neumonía). En muchos casos, se han registrado fiebres altas. (1) Se estima que en Estados Unidos ocurren anualmente entre 10.000 y 25.000 casos de infecciones de *Legionella pneumophila*.(2, 3) Entre el 5% y el 30% de los casos de legionelosis, acaban derivando en la muerte del paciente. Las infecciones extrapulmonares se pueden propagar a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático, infectando el corazón, cerebro, riñón, hígado y/o bazo. Los métodos comunes de detección de la *Legionella pneumophila* incluyen un cultivo, una prueba de anticuerpo fluorescente directo y de anticuerpo fluorescente indirecto, inmunoensayos enzimáticos y reacción en cadena polimerasa.(5, 6) La *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria gram-positiva aislada por primera vez por Pasteur en 1881 de la saliva de un paciente con rabia.(7) La estructura química y la antigenicidad del polisacárido capsular neumocócica, así como su asociación con la virulencia y su papel en las enfermedades humanas, se explicaron durante el periodo de 1915 a 1945. Estas bacterias son organismos anaerobios en forma de lanceta que se propagan por contacto estrecho de persona a persona mediante gotitas respiratorias causando serias enfermedades en humanos. Se estima que los 10 serotipos más comunes son los responsables de alrededor del 62% de las enfermedades invasivas a nivel mundial.(8) La *Streptococcus pneumoniae* coloniza el tejido del tracto respiratorio superior, causando neumonía severa y dolor de oídos/otitis de media a aguda.(9) Los neumococos causan entre el 13% y el 19% de todos los casos de meningitis bacteriana en Estados Unidos.(10) Un cuarto de los pacientes con meningitis neumocócica tienen también neumonía. Los síntomas clínicos generalmente son similares a los de otras formas de meningitis bacteriana purulenta, incluyendo dolor de cabeza, letargia, vómitos, irritabilidad, fiebre, rigidez de nuca, signos craneales, convulsiones y coma. La letalidad de la meningitis neumocócica es de alrededor del 30% pudiendo llegar al 80% en ancianos. La neumonía bacteriana representa entre el 12-16% de las enfermedades neumocócicas invasivas entre niños de 2 años o menos, mientras que la *S. pneumoniae* se ha convertido en la principal causa de meningitis bacteriana entre niños menores de 5 años en Estados Unidos. El tratamiento antibiótico es eficiente incluso en la mayor parte de las cepas resistentes a la penicilina identificadas.(11) Existen disponibles varias vacunas, con eficiencia variada, en función de las características del paciente, como la edad, enfermedades crónicas o inmunodeficiencia. Sin embargo, se ha demostrado que las vacunas ofrecen protección contra la neumonía neumocócica.(12)

3. Principio del test

El test NADAL® Legionella/S. pneumoniae está formado por una carcasa de plástico que contiene dos tiras de test internas diferentes para la detección de *Legionella* y *Streptococcus*. Los anticuerpos monoclonales de *Legionella* y *Streptococcus* coloreados, conjugados con oro coloidal, se sitúan en la respectiva almohadilla de cada membrana. En cada pocillo de muestra (⇔) del casete de test se dispensan algunas gotas de la muestra de orina. Una vez que la muestra migra a través de la membrana, el anticuerpo conjugado marcado se une a los antígenos de *Legionella* y *Streptococcus* (si están presentes en la muestra) formando complejos anticuerpo-antígeno. Estos complejos se unen a los anticuerpos policlonales de *Legionella* o *Streptococcus* en la región de la línea de test (T) de cada casete, formando una línea rosa. Si no está presente la *Legionella* o *Streptococcus*, no aparecerán las líneas de la región de prueba. La mezcla reactiva sigue migrando a través de las membranas, hasta alcanzar la región de las líneas de control (C). Otros conjugados de anticuerpos se unen a los reactivos en las regiones de las líneas de control (C), formando líneas de color rosa. La línea de control debería aparecer siempre en cada región de control (C), independientemente de la presencia o ausencia de la línea de test, indicando que el volumen de muestra añadido ha sido adecuado y que la membrana se ha humedecido suficientemente.

4. Reactivos y materiales provistos

- 10 casetes de test NADAL® Legionella/S. pneumoniae (pipetas desechables incluidas)
- 1 manual de instrucciones

5. Otros materiales necesarios

- Cronómetro
- Recipiente para la recolección de la muestra

6. Almacenamiento y conservación

Mantenga el dispositivo dentro de su envase sellado a 4-30°C. No congele el kit. El test se mantiene estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase.

7. Advertencias y precauciones

- Solo apto para uso profesional de diagnóstico *in-vitro*.
- Lea detenidamente este manual de instrucciones antes de la realización del test.
- No utilice los kits después de su fecha de caducidad.
- Utilice el test solo con muestras de orina.
- No reutilice los dispositivos.
- No debe utilizar el test si el envase está dañado.
- No coma, beba o fume durante la manipulación de las muestras y la realización de la prueba.
- Manipule las muestras como si contuviesen agentes infecciosos.
- Siga durante todo el procedimiento las precauciones establecidas para riesgos microbiológicos y las directrices estándar para la eliminación de las muestras.
- Use ropa protectora, como bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección, mientras manipule las muestras y ejecute las pruebas.
- La eliminación de los materiales utilizados debe realizarse de acuerdo con las regulaciones locales.

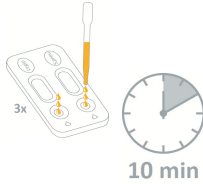
- La humedad y la temperatura pueden afectar negativamente a los resultados.

8. Recolección de muestras y preparación

Recoja una muestra de orina en un recipiente limpio que no contenga restos de detergente. Para unos mejores resultados, es preferente utilizar la primera orina de la mañana, ya que podría contener la mayor concentración de la bacteria. Si no va a realizar el test inmediatamente, refrigere la muestra (2-8°C) durante un máximo de 24 horas. En ese caso, lleve la muestra a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Si la realización de la prueba se retrasa más de 24 horas, debe congelar las muestras. En este caso, antes de realizar la prueba, debe descongelarlas completamente, mezclarlas bien y llevarlas a temperatura ambiente. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

9. Procedimiento del test

1. Lleve todos los componentes y muestras del test a temperatura ambiente.
2. Retire el casete de test de su envase sellado.
3. Etiquete el casete de test con el nombre del paciente o número de control.
4. Llene una pipeta con orina. Sujetándola verticalmente, añada 3 gotas de orina en cada pocillo de muestra (⇨).
5. Lea los resultados del test a los 10 minutos. No interprete los resultados pasados 15 minutos.



10. Interpretación de los resultados

Positivo para Legionella pneumophila:
Aparece una línea coloreada en cada zona de control (C) y una línea roja en el área de la línea de test (T) para Legionella pneumophila (LEGIO).



Positivo para Streptococcus pneumoniae:

Aparece una línea coloreada en cada región de control (C) y una línea coloreada en la región de test (T) para Streptococcus pneumoniae (S.PNEU).



Positivo para Legionella pneumophila y Streptococcus pneumoniae:

Además de las líneas de control (C), aparece una línea roja/rosa en cada región de test para Legionella pneumophila y Streptococcus pneumoniae.



Negativo:

Aparece una línea coloreada en la región de control (C). No aparece línea coloreada en el área de la línea de test (T).



No válido:

No aparecen las líneas de control. Si no aparecen las líneas de control dentro del tiempo de lectura especificado, los



resultados del test no son válidos y deben descartarse.

Las causas más frecuentes de que no aparezca la línea de control, son un volumen de muestra insuficiente, un procedimiento incorrecto o que el dispositivo esté caducado. En ese caso, revise el procedimiento y repita la prueba con un nuevo casete de test. Si el problema persiste, deje de usar el kit inmediatamente y contacte con su distribuidor.

11. Control de calidad

El dispositivo contiene un control interno del procedimiento. Se trata de la línea coloreada que aparece en la región de control (C). Esta línea confirma que el volumen de muestra ha sido adecuado, que la membrana se ha humedecido suficientemente y que la técnica de procedimiento ha sido correcta

12. Limitaciones

- El test NADAL® Legionella/S. pneumoniae está diseñado para la detección de antígenos de Legionella y Streptococcus en muestras de orina humanas. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de Legionella pneumophila. La concentración de antígenos puede estar por debajo del punto de corte del test. Se recomienda la utilización de cultivos para pacientes en los que se sospeche neumonía para detectar la presencia de agentes causales diferentes a la Legionella pneumophila.
- Si se sospecha un resultado positivo (p. ej. positivo sin signos clínicos de la enfermedad), se debe repetir el test con la misma muestra de orina, después de que haya sido calentada a 100°C para desnaturar las proteínas de la orina sin afectar a los antígenos de Legionella.
- Los resultados positivos falsos se pueden obtener de pacientes tratados con inyección de suero de conejo con anticuerpos antilinfocitos. Estos anticuerpos anti-linfocitos se pueden eliminar calentando las muestras de orina sin afectar a los antígenos de Legionella (tal como se describe en el punto anterior).
- El test proporciona un diagnóstico de presunción de infección de Legionella pneumophila. Sin embargo, este diagnóstico no se debe basar únicamente en evidencias clínicas o radiológicas. Los métodos de detección de antígenos, los cultivos clínicos y las pruebas serológicas se deben utilizar conjuntamente con todos los hallazgos clínicos, para obtener un diagnóstico más preciso.
- Los inmunoensayos sensibles pueden mostrar resultados positivos con muestras que contienen anticuerpos heterófilos. Si la interpretación cualitativa es contraria a los hallazgos clínicos, se deben realizar otras pruebas con métodos alternativos.
- La excreción de los antígenos de Legionella ya se puede observar a los tres días de la aparición de los síntomas. Sin embargo, se pueden seguir excretando hasta un año después. Con el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae puede ocurrir un resultado positivo con infecciones tanto actuales como pasadas.
- Este test no diferencia entre individuos colonizados e infectados.
- El test NADAL® Legionella/S. pneumoniae no distingue entre las diferentes infecciones neumocócicas

potencialmente inducidas por *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, para hacer un diagnóstico preciso, los resultados de los cultivos, las pruebas serológicas y los métodos de detección de antígenos se deberían utilizar conjuntamente con otros hallazgos clínicos.

- Al igual que con otros procedimientos de diagnóstico, el personal médico debe evaluar los resultados de este test, junto con otra información clínica.

13. Características de rendimiento

1. Legionella

a) Sensibilidad y especificidad

Se ha realizado un estudio comparativo entre el test rápido BinaxNOW® Legionella y el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae utilizando un panel de 48 muestras de orina humanas.

En la siguiente tabla se muestran los resultados:

| | | Test rápido BinaxNOW® Legionella (método de referencia) | | |
|--------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae | Positivo | 8 | 0 | 8 |
| | Negativo | 0 | 40 | 40 |
| | Total | 8 | 40 | 48 |

Como se observa en la tabla anterior, la sensibilidad de diagnóstico del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae es del 100% (8/8), y la especificidad es del 100% (40/40), comparado con el método de referencia. El acuerdo general es 100% (48/48).

b) Reactividad cruzada

Las cepas de *Legionella* indicadas abajo se cultivaron y prepararon para una concentración de 1×10^8 CFU/mL en solución salina. Cada cepa de prueba se analizó con el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Ninguno de los organismos indicados presentó reacción cruzada con el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 2-14 | <i>Legionella anisa</i> |
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Legionella dumoffii</i> |
| <i>Legionella feeleeii</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella hackeliae</i> | <i>Legionella micdadei</i> |
| <i>Legionella longbeachae</i> | |

Se prepararon otras cepas de la bacteria diferentes a la *Legionella* a una concentración de 3×10^8 CFU/mL en salina y se analizaron con el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Los organismos presentados en la lista siguiente no presentaron reacciones cruzadas con el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus valgaris</i> |
| <i>Pseudomonas seruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |

c) Reproducibilidad intraensayo

Se evaluó la reproducibilidad intraensayo utilizando 10 réplicas de 4 diluciones de muestra con diferente concentración de *Legionella*. Todas las series mostraron resultados convergentes y esperados. La reproducibilidad intralote del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae es del 100%.

2. Streptococcus

a) Sensibilidad y especificidad

Se realizó un estudio comparativo entre el test rápido BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae y el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae utilizando un panel de 16 muestras frescas de orina y 42 muestras de orina almacenadas.

En la siguiente tabla se muestran los resultados:

| | | Test rápido BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae (método de referencia) | | |
|--------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae | Positivo | 26 | 4 | 30 |
| | Negativo | 7 | 21 | 28 |
| | Total | 33 | 25 | 58 |

Como se observa en la tabla anterior, la sensibilidad de diagnóstico del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae es del 79% (26/33) y la especificidad es del 84% (21/25) comparado con el método de referencia. El acuerdo general es de 81% (47/58) y es satisfactorio a pesar de que un almacenamiento prolongado de las 42 muestras (33 positivas y 9 negativas) puede causar la degradación de los antígenos de *Streptococcus pneumoniae*.

b) Reactividad cruzada

Se analizaron cepas diferentes de la bacteria utilizando el test NADAL® Legionella/S. pneumoniae para determinar si se producen reacciones no específicas (reacciones cruzadas).

En la siguiente tabla se muestran los resultados:

| Grupo | Resultado |
|--------------------------------|-----------|
| Positivo | Positivo |
| Strep A, B, C, D, E, F, G, & H | Negativo |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> | Negativo |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Negativo |

c) Reproducibilidad intraensayo

Se evaluó la reproducibilidad intraensayo mediante 10 réplicas de 5 diluciones de muestras con diferentes concentraciones de *Streptococcus pneumoniae*. Todas las series mostraron resultados convergentes y esperados. La reproducibilidad intralote del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae es del 100%.

14. Referencias

1. Edelstein, P.H. and Meyer, R.D., 'Legionella Pneumonias' In Respiratory infection: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New-York: Raven Press, Ltd. 1994.
2. Marston, B.J., Lipman, H.B. and Breiman, R.F. Arch. Intern. Med., 154, 2417-2422 (1994).
3. Horwitz, M.A., Marston, B.J., Broone, C.V. and Freiman, R.F. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology (1993).
4. Kohler, R. B. Winn, W.C. Jr and Wheat, L.J. J. Clin. Microbiol., 20, 605-607 (1984).
5. Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Christie, P., Johnston, F. and Edwards, G.F.S. J. Med. Microbiol., 53, 183-187 (2004).
6. Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. J. Clin. Microbiol., 38, 1709-1712 .
7. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
8. CDC. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34): 1102-1106, 2010.
9. Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews, Microbiology, 6 (4) doi : 10.1038/nrmicro1871, 2008.
10. Robinson, K.A., Baughman, W., Rothrock, G. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998. Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA, 285: 1729-1735, 2001.
11. Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States. N. Engl. J. Med., 343: 1917-1924, 2000.
12. Tsai, C.J., Griffin, M.R., Nuorti, J.P. et al. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. Clin. Infect. Dis., 46 : 1664-1672, 2008.

Rev. 1, 2017-03-07 MP

1. Scopo del test

Il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae è un test immunocromatografico rapido a flusso laterale per l'individuazione qualitativa degli antigeni della *Legionella pneumophila* e dello *Streptococcus pneumoniae*. Il test va considerato come coadiuvante nella diagnosi legionellosi, polmonite, meningite e otite.

2. Introduzione e Significato Clinico

I batteri della Legionella sono batteri gram-negativo associati generalmente alla febbre di Pontiac e alla Legionellosi responsabili di infezioni del tratto respiratorio superiore e di gravi malattie polmonari quali la polmonite. Nella maggior parte dei casi sono stati riportati episodi di febbre alta. (1) Negli Stati Uniti si verificano ogni anno tra 10,000 a 25,000 casi di infezioni causate dal batterio della *Legionella pneumophila*. (2, 3) Per circa il 5%- 30% delle persone affette, la Legionellosi risulta fatale. Le infezioni extrapolmonari possono diffondersi nel sistema sanguigno o linfatico contagiando cuore, cervello, reni, fegato e/o milza. Tra i metodi più comuni di rilevazione degli antigeni della *Legionella pneumophila* ci sono colture, immunofluorescenza diretta, immuno-fluorescenza indiretta, immunodosaggi enzimatici e reazione a catena della polimerasi (PCR). (5, 6) *Lo Streptococcus pneumoniae* è un batterio gram-positivo isolato per la prima volta da Pasteur nel 1881 nella saliva di un paziente affetto da rabbia. (7) La struttura chimica e antigenica del polisaccaride capsulare pneumococco, la scoperta della sua virulenza e il conseguente ruolo di causa di malattie umane furono resi noti tra il 1915 ed il 1945. I batteri sono organismi anaerobici che si diffondono attraverso il contatto diretto da persona a persona con secrezioni respiratorie causando così serie malattie. I 10 serotipi più comuni si stima siano responsabili di circa il 62% delle malattie batteriche nel mondo. (8) *Lo Streptococcus pneumoniae* colonizza nei tessuti del tratto respiratorio superiore causando gravi polmoniti e otalgiti/otiti medio/acute. (9) I Pneumococchi sono responsabili di circa il 13%-19% delle meningiti batteriche negli Stati Uniti. (10) Un quarto dei pazienti affetti da meningiti pneumococciche sono generalmente affetti anche da polmonite. I sintomi clinici sono generalmente simili a quelli di meningiti batteriche purulente e includono febbre, mal di testa, indolenza, vomito, irritabilità, febbre, rigidità nucale, lesioni della cavità cranica, epilessia e coma. La percentuale di fatalità delle meningiti pneumococciche è di circa il 30% ma può raggiungere anche l'80% in base all'età. La polmonite batterica conta il 12%-16% delle malattie pneumococciche invasive tra i bambini di 2 anni o più piccoli mentre lo *Streptococcus pneumoniae* è diventato la causa principale di meningiti batteriche tra i bambini con meno di 5 anni di età negli Stati Uniti. I trattamenti antibiotici sono efficaci anche se sono stati identificati numerosi ceppi batterici resistenti alla penicillina. (11) Sono disponibili molti vaccini il cui livello di efficacia varia in base a fattori quali età del paziente, malattie croniche o immunodeficienza. In ogni caso è stato dimostrato che i vaccini forniscono una efficace protezione contro la polmonite pneumococcica. (12)

3. Principio del Test

Il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae è un Test a cassetta che consiste in un dispositivo di plastica contenente due

strisce interne per la rilevazione degli antigeni della *Legionella* e dello *Streptococcus*. Gli anticorpi monoclonali della *Legionella* e dello *Streptococcus* sono coniugati con particelle oro colloidal e posizionati in corrispondenza del rispettivo tampone coniugato di ogni membrana. Versare poche gocce del campione di urina in ogni pozzetto di raccolta del campione (⇒) del test a cassetta. Quando il campione inizia a migrare lungo le membrane, il complesso anticorpo-coniugato si lega agli antigeni della *Legionella* e dello *Streptococcus* (se presenti nel campione) formando i complessi anticorpo-antigene. Questi complessi si legano agli anticorpi policlonali della *Legionella* o dello *Streptococcus* nella regione della linea del test (T) di ogni test a cassetta, portando alla comparsa di una linea di colore rosato. In assenza di *Legionella* o *Streptococcus* non comparirà alcuna linea nella regione delle linee del test (T). Il composto di reazione continua poi a migrare lungo le membrane verso la regione della linea di controllo (C). Gli anticorpi coniugati si legano ai reagenti nelle regioni della linea di controllo (C) producendo linee di colore rosato. La linea di controllo dovrebbe sempre comparire nella rispettiva area di reazione indipendentemente dalla presenza oppure dall'assenza della linea del test, indicando che è stato aggiunto un volume sufficiente di campione e che la migrazione lungo la membrana è avvenuta correttamente.

4. Reagenti e Materiali Forniti

- 10 test NADAL® Legionella/S. pneumoniae (pipette monouso incluse)
- 1 istruzioni per l'uso

5. Ulteriori materiali richiesti

- Timer
- Contenitore di raccolta del campione

6. Conservazione e Stabilità

I test vanno conservati nella loro confezione a 4-30°C. Non congelare i test. I test rimangono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

7. Avvertenze e Precauzioni

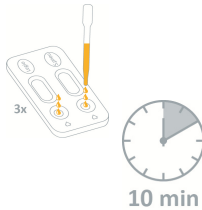
- Esclusivamente per uso diagnostico professionale *in-vitro*.
- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di eseguire il test.
- Non utilizzare i test oltre la data di scadenza.
- Utilizzare esclusivamente campioni di urina.
- Non riutilizzare i test.
- Non utilizzare il test se la confezione dovesse risultare danneggiata.
- Non mangiare, bere o fumare nei luoghi in cui vengono trattati i campioni ed i test.
- Considerare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- Osservare le normali precauzioni contro rischi microbiologici e seguire le procedure standard per il corretto smaltimento dei campioni.
- Indossare abiti protettivi quali camici da laboratorio, guanti monouso ed occhiali protettivi quando vengono trattati i campioni.
- I materiali utilizzati nello svolgimento del test vanno smaltiti nel rispetto delle regolamentazioni locali.
- Umidità o temperature elevate possono influenzare in maniera negativa i risultati del test.

8. Preparazione e Raccolta del Campione

Raccogliere il campione di urina in un contenitore sterile pulito. Per ottenere risultati ottimali, è preferibile utilizzare campioni di prima urina del mattino, in quanto tali campioni dovrebbero contenere la più alta concentrazione di batteri. Se il campione non viene analizzato immediatamente, si consiglia di conservarlo al fresco (2-8°C) fino a 24 ore. In tal caso portare il campione a temperatura ambiente prima di eseguire il test. Se si prevede di eseguire il test oltre le 24 ore, si consiglia di congelare il campione. Prima di eseguire il test scongelare completamente il campione, mescolare energicamente e portare a temperatura ambiente prima di eseguire il test. Si consiglia di evitare il congelamento e scongelamento ripetuto di reagenti e campioni.

9. Procedura del Test

1. Portare tutti i test, i loro componenti e i campioni a temperatura ambiente prima di eseguire il test.
2. Rimuovere il test a cassetta dalla sua confezione.
3. Etichettare i test con il nome del paziente o con il codice identificativo.
4. Riempire la pipetta con il campione di urina. Mantenendola in posizione verticale, aggiungere 3 gocce di urina in ogni pozzetto di raccolta di campione (⇨).
5. Leggere i risultati dei test entro 10 minuti. Non interpretare i risultati dopo 15 minuti.



10. Interpretazione dei Risultati

Positivo alla *Legionella pneumophila*:

Compare una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata si sviluppa nella regione della linea del test (T) per la *Legionella pneumophila* (LEGIO).



Positivo per la polmonite *Streptococcica*

Si sviluppa una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata nella regione della linea del test (T) per lo *Streptococcus pneumoniae* (S.PNEU).



Positivo per *Legionella pneumophila* e polmonite *Streptococcica*:

Insieme alle linee di controllo (C), compare una linea rosso/rosa in ogni area della linea del test rispettivamente per *Legionella pneumophila* e polmonite *Streptococcica*.



Negativo:

Si sviluppa una linea colorata nella regione della linea di controllo (C). Non compare alcuna linea nella regione della linea del test (T).



Non valido:

la linea di controllo non compare. I risultati di qualsiasi test che non abbia prodotto alcuna linea di controllo entro i tempi di lettura indicati, non vanno presi in considerazione.



Un volume insufficiente di campione, procedure operative scorrette o test scaduti sono tra le principali cause che potrebbero impedire la comparsa della linea di controllo. In tal caso si consiglia di rivedere la procedura e ripetere il test utilizzando un nuovo test a cassetta. Se il problema persiste, si consiglia di interrompere immediatamente l'utilizzo dello stesso lotto di test e contattare il proprio distributore.

11. Controllo Qualità

Un controllo procedurale interno è inserito nel test a cassetta:

La linea colorata che compare in corrispondenza della regione della linea di controllo (C) è da considerarsi un controllo procedurale interno. Ciò conferma che è stato utilizzato un volume sufficiente di campione, che la migrazione lungo la membrana è avvenuta in maniera corretta e che sono state applicate le giuste tecniche procedurali.

12. Limiti del Test

- Il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae è un Test pensato per la rilevazione degli antigeni della *Legionella* e dello *Streptococco* in campioni di urina umana. Un risultato negativo non preclude la possibilità di infezioni causate dal batterio della *Legionella pneumophila*. La concentrazione di antigeni potrebbe infatti trovarsi al di sotto dei limiti di rilevazione del test. Si raccomanda, pertanto, che l'analisi venga svolta anche su colture per quei pazienti che si sospetta siano affetti da polmonite al fine di rilevare la presenza di agenti causativi differenti dalla *Legionella pneumophila*.
- In caso di sospetto di falso risultato positivo (cioè un risultato positivo senza alcun sintomo clinico della malattia), si consiglia di ripetere il test sullo stesso campione di urina dopo averlo scaldato a 100°C al fine di denaturare le proteine dell'urina senza produrre alcun effetto sugli antigeni della *Legionella*.
- Falsi risultati positivi possono essere ottenuti per quei pazienti trattati con iniezioni di siero di coniglio anti-linfociti. Gli anticorpi anti-coniglio possono essere eliminati riscaldando il campione di urina senza intaccare gli antigeni della *Legionella* (come descritto al punto precedente).
- Questo test fornisce una diagnosi preventiva per le infezioni da *Legionella pneumophila*. Al fine di emettere una diagnosi accurata si consiglia di impiegare il presente test in congiunzione con altri esami clinici ed altre tipologie di analisi quali ad esempio risultati di colture, test serologici e altri metodi per la rilevazione degli antigeni.
- Immunodosaggi altamente sensibili potrebbero mostrare dei risultati positivi con campioni contenenti anticorpi eterofili. Se l'interpretazione qualitativa risulta inconsistente con altre analisi cliniche, si consiglia di eseguire ulteriori test impiegando metodi di analisi alternativi.

- La presenza di antigeni della *Legionella* è già individuabile dopo tre giorni dalla comparsa dei sintomi. Gli antigeni potrebbero restare visibili fino ad un anno. Un risultato positivo del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae potrebbe, pertanto, verificarsi sia per un'infezione in corso che un'infezione pregressa.
- Il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae non distinguerà tra individui colonizzati ed individui infetti.
- Il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae non è in grado di distinguere tra differenti tipi di infezioni pneumococciche potenzialmente indotte dallo *Streptococcus pneumoniae*. Pertanto, al fine di emettere una diagnosi accurata, si consiglia di impiegare il presente test in congiunzione con altri esami clinici ed altre tipologie di analisi quali ad esempio risultati di colture, test serologici e altri metodi per la rilevazione degli antigeni.
- Come per tutti i test diagnostici, il medico dovrebbe interpretare i dati ottenuti con questo test, alla luce di altre informazioni cliniche.

13. Caratteristiche Tecniche

1. Legionella

a) Sensibilità e specificità

È stato condotto uno studio comparativo tra il test rapido BinaxNOW® Legionella ed il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae su un gruppo di 48 campioni di urina umana. I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

| | | Test rapido BinaxNOW® Legionella (metodo di riferimento) | | |
|---------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------|----------|--------|
| | | Positivo | Negativo | Totale |
| Test NADAL® Legionella/ S. pneumoniae | Positivo | 8 | 0 | 8 |
| | Negativo | 0 | 40 | 40 |
| | Totale | 8 | 40 | 48 |

In base al totale riportato sopra, la sensibilità diagnostica del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae è del 100% (8/8) e la specificità è del 100% (40/40) se comparato al metodo di riferimento impiegato. Andamento complessivo: 100% (48/48).

b) Reattività incrociata

I ceppi di *Legionella* riportati nella tabella seguente, derivano da colture preparate con una concentrazione di 1×10^8 CFU/mL in soluzione salina. Ogni ceppo è stato testato utilizzando il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Nessuno degli organismi riportati di seguito ha mostrato episodi di reattività incrociata con il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|---------------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 2-14 | <i>Legionella anisa</i> |
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Legionella dumoffii</i> |
| <i>Legionella feeleii</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella hackeliae</i> | <i>Legionella micdadei</i> |
| <i>Legionella longbeachae</i> | |

I ceppi di batteri diversi dal gene della *Legionella* sono stati preparati con una concentrazione di 3×10^8 CFU/mL in soluzione salina ed analizzati con il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Nessuno degli organismi riportati di seguito ha

mostrato episodi di reattività incrociata con il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> |
| <i>Pseudomonas seruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |

c) Riproducibilità intra lotto

La riproducibilità intra-lotto è stata valutata eseguendo 10 ripetizioni di 4 diluizioni di campione con differenti concentrazioni di *Legionella*. Tutte le serie hanno mostrato risultati conformi ai risultati attesi. La riproducibilità intra-lotto del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae è del 100%.

2. Streptococco

a) Sensibilità e specificità

È stato condotto uno studio comparativo tra il test rapido BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae e il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae utilizzando un gruppo di 16 campioni di urina appena prelevati e 42 campioni di urina conservati.

I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

| | | Test rapido BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae (metodo di riferimento) | | |
|---------------------------------------------|----------|------------------------------------------------------------------------------|----------|--------|
| | | Positivo | Negativo | Totale |
| Test NADAL® Legionella/ S. pneumoniae | Positivo | 26 | 4 | 30 |
| | Negativo | 7 | 21 | 28 |
| | Totale | 33 | 25 | 58 |

In base al totale riportato sopra, la sensibilità diagnostica del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae è del 79% (26/33) e la specificità è dell'84% (21/25) se comparato al metodo di riferimento impiegato. L'andamento complessivo è dell'81% (47/58) e il risultato può considerarsi soddisfacente nonostante il fatto che il lungo periodo di conservazione a cui 42 campioni sono stati sottoposti (33 positivi e 9 negativi) potrebbe aver causato la degradazione degli antigeni dello *Streptococcus pneumoniae*.

b) Reattività incrociata

Sono stati analizzati diversi ceppi di batteri utilizzando il test NADAL® Legionella/S. pneumoniae al fine di stabilire il verificarsi o meno di reazioni non specifiche (reazioni incrociate).

I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

| Gruppo | Risultato |
|------------------------------------------|-----------------|
| Strep-Pneumo tipo capsulare | Positivo |
| Strep A, B, C, D, E, F, G & H | Negativo |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Negativo |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Negativo |

c) Riproducibilità intra lotto

La riproducibilità intra-lotto è stata valutata eseguendo 10 ripetizioni su 5 diluizioni di campioni con differenti concentrazioni di *Streptococcus pneumoniae*. Tutte le serie hanno mostrato risultati conformi ai risultati attesi. La riproducibilità intra-lotto del test NADAL® Legionella/S. pneumoniae è del 100%.

14. Bibliografia

1. Edelstein, P.H. and Meyer, R.D., 'Legionella Pneumonias' In Respiratory infection: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New-York: Raven Press, Ltd. 1994.
2. Marston, B.J., Lipman, H.B. and Breiman, R.F. Arch. Intern. Med., 154, 2417-2422 (1994).
3. Horwitz, M.A., Marston, B.J., Broone, C.V. and Freiman, R.F. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology (1993).
4. Kohler, R. B. Winn, W.C. Jr and Wheat, L.J. J. Clin. Microbiol., 20, 605-607 (1984).
5. Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Christie, P., Johnston, F. and Edwards, G.F.S. J. Med. Microbiol., 53, 183-187 (2004).
6. Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. J. Clin. Microbiol., 38, 1709-1712.
7. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J., Snippe, H. Streptococcus pneumoniae : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
8. CDC. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34): 1102-1106, 2010.
9. Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews, Microbiology, 6 (4) doi: 10.1038/nrmicro1871, 2008.
10. Robinson, K.A., Baughman, W., Rothrock, G. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998. Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA, 285: 1729-1735, 2001.
11. Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States. N. Engl. J. Med., 343: 1917-1924, 2000.
12. Tsai, C.J., Griffin, M.R., Nuorti, J.P. et al. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. Clin. Infect. Dis., 46 : 1664-1672, 2008.

Rev. 1, 2017-03-07 BN

1. Zastosowanie

Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae jest szybkim chromatograficznym testem typu Lateral Flow do jakościowego oznaczania antygenów *Legionella pneumophila* oraz *Streptococcus pneumoniae* w ludzkim moczu. Test przeznaczony jest jako środek pomocniczy przy diagnozie infekcji *Legionella* (choroby legionistów), zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowych i zapalenia ucha.

2. Wprowadzenie i znaczenie diagnostyczne

Legionella to gram-ujemne bakterie, które powiązane są z gorączką Pontiac oraz chorobą legionistów mogące powodować infekcje górnych dróg oddechowych oraz zapalenie płuc (Pneumonie). W wielu przypadkach występuje gorączka.(1) Szacuje się, że w USA rocznie pojawia się od 10.000 do 25.000 przypadków infekcji *Legionella pneumophila*.(2, 3) Około 5% do 30% osób z chorobą legionistów umiera z tego powodu. Pozapalne infekcje mogą być roznoszone przez układ krążenia lub system limfatyczny, atakując przy tym serce, mózg, nerki, wątrobę i/lub śledzionę. Zwykłe metody oznaczania *Legionella pneumophila* włączają kultury bakterii, bezpośrednie badania fluorescencji przeciwciał, pośrednie badania fluorescencji przeciwciał, reakcje łańcuchowe enzymatycznych testów immunologicznych oraz polimerazy.(5, 6) *Streptococcus pneumoniae* jest gram-dodatnią bakterią, która po raz pierwszy wyizolowana została w roku 1881 ze śliny pacjenta ze wścieklizną Pasteura.(7) Chemiczna struktura i antygenność polisacharydu otoczki pneumokokkowej, jak również jego połączenie z chorobotwórczością i jego rola przy ludzkich chorobach, zostały wyjaśnione w okresie pomiędzy 1915-1945. Bakterie te, to lancetowate organizmy beztenowe, które przenoszone są z człowieka na człowieka, drogą oddechową i wywołują u człowieka ciężkie choroby: według oszacowań, 10 najczęstszych serotypów odpowiedzialnych jest za około 62% inwazyjnych zachorowań na całym świecie.(8) *Streptococcus pneumoniae* osiedla tkankę górnych dróg oddechowych i powodują ciężkie zapalenie płuc oraz łagodne / ostre bóle uszu / zapalenie uszu.(9) Pneumokokki powodują od 13% do 19% wszystkich przypadków bakteryjnego zapalenia opon mózgowych w Stanach Zjednoczonych.(10). Jedna czwarta pacjentów z pneumokokowym zapaleniem opon mózgowych, ma również zapalenie płuc. Objawy kliniczne ogólnie podobne są do ropnego bakteryjnego zapalenia opon mózgowych i zalicza się do nich bóle głowy, letarg, wymioty, nadpobudliwość, gorączkę, sztywność karku oraz śpiączkę. Śmiertelność pneumokokowego zapalenia opon mózgowych wynosi ok. 30% ale u starszych osób może sięgać do 80%. 12-16% inwazyjnych zachorowań na pneumokokki u dzieci w wieku poniżej 2 roku życia to bakteryjne zapalenia płuc oraz *S.pneumoniae* i stały się głównym powodem bakteryjnego zapalenia opon mózgowych u dzieci poniżej 5 roku życia w Stanach Zjednoczonych. Antybiotykoterapia jest również skuteczna, nawet jeśli zidentyfikowanych jest coraz więcej szczepów odpornych na penicylinę.(11) Dostępne jest dużo szczepionek z różną wydajnością zależną od wieku pacjenta lub od tego, czy pacjent cierpi na choroby chroniczne lub ma słabą odporność organizmu. Pomimo wszystko udowodniono, że szczepionki przeciwko pneumokokkowemu zapaleniu płuc, są skuteczne.(12)

3. Zasada działania testu

Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae składa się z plastikowej obudowy, która wewnątrz zawiera 2 paski do oznaczania *Legionella* i streptokoków. Sprężone koloidalnym złotem kolorowe monoklonalne przeciwciała *Legionella*- ew. *Streptococcus*- są powleczone na płytce z koniugatem na membranie. Należy dodać kilka kropli próbki moczu do każdego zagłębienia (⇨) na kasiecie testowej. Gdy próbka porusza się wzdłuż membrany, oznaczony koniugat przeciwciał wiąże *Legionella* ew. *Streptococcus* (jeżeli te zawarte są w próbce), przy czym powstają kompleksy przeciwciało-antygen. Kompleksy te wiążą się z poliklonalnymi przeciwciałami *Legionella* ew. *Streptococcus* w poszczególnych obszarach linii testowych (T) kasety testowej, przy czym powstaje każdorazowo różowa linia. Jeżeli w próbce nie znajdują się antygeny *Legionella* lub *Streptococcus*, w obszarze linii testowych (T) nie pojawią się linie. Mieszanka reakcyjna wędruje dalej wzdłuż membrany przez obszary linii kontrolnych (C). Kolejne koniugaty przeciwciał wiążą odczynniki w obszarach linii kontrolnych (C), przy czym każdorazowo powstaje różowa linia. Linia kontrolna powinna pojawić się zawsze w każdym obszarze linii kontrolnej (C), niezależnie od obecności lub nie wystąpieniu linii testowych i wskazuje, że dodana została wystarczająca ilość próbki oraz, że membrana jest wystarczająco nasączona.

4. Materiały zawarte w zestawie

- 10 testów kasetowych NADAL® Legionella/S. pneumoniae (wraz z jednorazowymi pipetami)
- 1 instrukcja obsługi

5. Dodatkowo potrzebne materiały

- Stoper
- Pojemniki na próbki

6. Data ważności i przechowywanie odczynników

Test powinien być przechowywany w zamkniętym opakowaniu foliowym w temperaturze 4-30°C. Zawartość testowych nie należy zamrażać. Test jest stabilny do daty użyteczności podanej na opakowaniu.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Tylko do profesjonalnej diagnostyki *in-vitro*.
- Przed przeprowadzeniem testu należy dokładnie przeczytać całą instrukcję obsługi.
- Zestawu testowego nie należy używać po upływie daty przydatności.
- Używać jedynie próbek moczu.
- Nie używać ponownie tych samych testów.
- Nie używać testu, jeżeli opakowanie foliowe jest uszkodzone.
- Nie jeść, nie pić i nie palić papierosów w obszarze, w którym pracuje się z próbkami oraz zestawami testowymi.
- Traktować wszystkie próbki tak, jakby zawierały zakaźne odczynniki.
- Należy zwrócić uwagę na zaistniałe środki ostrożności dla mikrobiologicznego ryzyka, podczas wszystkich procesów jak również standardowych dyrektyw dla odpowiedniej utylizacji próbek.

- Podczas kontaktu z próbkami, stosować odzież ochronną, taką jak fartuch, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne.
- Zużyte materiały testowe powinny być zutilizowane zgodnie z lokalnymi zaleceniami.
- Wilgoć oraz wysokie temperatury mogą mieć wpływ na wyniki testu.

8. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

Zebrać próbkę moczu do czystego zbiornika, który jest wolny od środków czyszczących. Dla lepszych wyników preferowany jest moc oddany rano, ponieważ ta próbka może zawierać wyższą koncentrację bakterii. Jeżeli przeprowadzenie testu nie nastąpi od razu, próbka powinna być schłodzona w temperaturze (2-8°C) i przechowana do 24 godzin. W tym przypadku należy przed przeprowadzeniem testu dorowdzić próbkę do temperatury pokojowej. Jeżeli przeprowadzenie testu zostanie przesunięte o więcej niż 24 godziny, to próbki powinny być zamrożone. Przed przeprowadzeniem testu, zamrożona próbka musi zostać kompletnie rozmrożona, dobrze wymieszana i doprowadzona do temperatury pokojowej. Unikać ponownego zamrażania i rozmrażania próbek.

9. Przeprowadzanie testu

1. Przed wykonaniem, doprowadzić wszystkie elementy składowe testu do temperatury pokojowej.
2. Wyciągnąć kasetę testową z opakowania foliowego.
3. Oznaczyć kasetę testową nazwiskiem pacjenta i numerem kontrolnym.
4. Napełnić pipetę moczem. Trzymać ją pionowo i dodać 3 krople próbki do każdego zagłębienia na próbce. (⇨).
5. Wynik należy interpretować po upływie 10 minut. Wyników nie odczytywać po upływie więcej niż 15 minut.



10. Interpretacja wyników

Pozytywny dla Legionella pneumophila:

pojawia się każdorazowo kolorowa linia w obszarach linii kontrolnych (C) oraz kolorowa linia w obszarze linii testowej (T) dla Legionella pneumophila (LEGIO).



Pozytywny dla Streptococcus pneumoniae:

pojawia się każdorazowo kolorowa linia w obszarach linii kontrolnych (C) oraz kolorowa linia w obszarze linii testowej (T) dla Streptococcus pneumoniae (S.PNEU).



Pozytywny dla Legionella pneumophila und Streptococcus pneumoniae:

dotychczas do linii kontrolnych (C) pojawia się każdorazowo czerwona/różowa linia w obszarze linii testowej (T) dla Legionella pneumophila (LEGIO) oraz Streptococcus pneumoniae (S.PNEU).



Negatywny

Pojawia się każdorazowo kolorowa linia w obszarach linii kontrolnej (C). Nie pojawiają się linie w obszarach linii testowych (T).



Nieważny

Linie kontrolne nie pojawiają się. Jeżeli linie kontrolne nie pojawiły się po upływie czasu odczytu, wyniki testów muszą zostać odrzucone.



Niewystarczająca objętość próbki, przeterminowane testy lub niewłaściwy sposób użytkowania testu, są najprawdopodobniejszymi przyczynami niepojawienia się linii kontrolnej. W takim przypadku należy ponownie zapoznać się z procedurą przeprowadzania testu i przeprowadzić badanie przy użyciu nowego testu. W momencie, gdy problem będzie występował ponownie, nie stosować zestawu testowego i skontaktować się z dystrybutorem.

11. Kontrola jakości

Test kasetyowy zawiera wewnętrzną kontrolę:

Pojawiająca się w obszarze linii kontrolnej (C) kolorowa linia, traktowana jest jako kontrola procesowa. Potwierdza ona dodanie wystarczającej ilości próbki, prawidłowe przeprowadzenie testu oraz wystarczające nasączenie membrany.

12. Ograniczenia testu

- Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae służy do oznaczania antygenów Legionella i streptokoków w ludzkim moczu. Negatywny wynik nie wyklucza możliwej infekcji Legionella pneumophila. Koncentracja antygeny może obniżyć się poniżej poziomu granicy wykrywalności. Zaleca się stosowanie kultur bakterii dla pacjentów z podejrzeniem Pneumonie, aby oznaczyć obecność innych zarazków niż Legionella pneumophila.
- Przy podejrzeniu fałszywie pozytywnego wyniku (tzn. wynik pozytywny bez klinicznych objawów choroby), test musi zostać powtórzony z tą samą próbką moczu, po tym jak próbka zostanie podgrzana przez 5 minut w temperaturze 100°C, w celu denaturacji próbki, nie wpływając na antygeny Legionella.
- Fałszywie pozytywne wyniki mogą pojawić się u pacjentów, którym podano szczepionkę przeciwiał przeciwko limfocytom, zawierającą surowicę króliczą. Przeciwciała przeciw limfocytom mogą zostać wyeliminowane poprzez podgrzanie próbki moczu, nie wywierając wpływu na antygeny Legionella (jak opisano w poprzednim punkcie).
- Test dostarcza podejrzenie diagnozy infekcji Legionella pneumophila. Jednak wynik ten nie powinien opierać się wyłącznie na klinicznych lub radiologicznych wynikach. Aby postawić precyzyjną diagnozę infekcji Legionella pneumophila należy porównać wyniki badań z kultur bakterii, badań serologicznych i metody oznaczania antygenów z wynikami klinicznymi.
- Czułe testy immunologiczne mogą wykazywać pozytywne wyniki przy próbkach, które zawierają przeciwciała heterofilne. Jeżeli jakościowa interpretacja będzie przeczyła

badaniom klinicznym, to przeprowadzone zostać powinny kolejne testy innymi metodami alternatywnymi.

- Wydalanie antygenów *Legionella* może zostać zaobserwowane już po 3 dniach od występowania objawów. Jednakże antygeny mogą być dalej wytrącane nawet do jednego roku. Pozytywny wynik testu NADAL® Legionella/S. pneumoniae może wystąpić podczas aktualnej lub przebytej infekcji.
- Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae nie rozróżnia pomiędzy osobami skolonizowanymi i zakażonymi.
- Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae nie może rozróżnić różnych potencjalnych infekcji pneumokokami, które potencjalnie spowodowane zostały *Streptococcus pneumoniae*. Aby postawić precyzyjną diagnozę infekcji *Legionella pneumophila*, wyniki kultur bakterii, serologiczne badania i metody oznaczania antygenów powinny być stosowane w połączeniu -z wynikami klinicznymi.
- Według postępowania we wszystkich diagnostycznych procesach, lekarz powinien porównać wszystkie uzyskane przy pomocy tego testu dane z innymi informacjami klinicznymi.

13. Charakterystyka testu

1. Legionella

a) Czułość i swoistość

Przeprowadzone zostały badania porównawcze pomiędzy szybkim testem BinaxNOW® Legionella a testem NADAL® Legionella/S. pneumoniae, przy zastosowaniu panelu 48 ludzkich próbek moczu.

Wyniki zostały przedstawione w poniższej tabeli:

| | | Szybki test BinaxNOW® Legionella (metoda referencyjna) | | |
|--------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|------------|------|
| | | Pozytyw-ny | Negatyw-ny | Suma |
| Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae | Pozytyw-ny | 8 | 0 | 8 |
| | Negatyw-ny | 0 | 40 | 40 |
| | Suma | 8 | 40 | 48 |

Z wyżej wskazanej tabeli wynikają diagnostyczna czułość i swoistość testu NADAL® Legionella/S. pneumoniae o wartości każdorazowo 100% (8/8, 40/40) w porównaniu do metody referencyjnej. Całkowita zgodność wynosi 100% (48/48)

b) Reakcje krzyżowe

Niżej wymienione szczepy *Legionella* zostały kulturowane i przygotowane na koncentrację zastosowania w roztworze soli o wartości 1×10^8 CFU/mL. Każdy szczep podlegający badaniu, został przetestowany przy pomocy testu NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Żaden z niżej wymienionych organizmów nie wchodzi w reakcję krzyżową z testem NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> serogrupa 2-14 | <i>Legionella anisa</i> |
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Legionella dumoffii</i> |
| <i>Legionella feeleii</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella hackeliae</i> | <i>Legionella micdadei</i> |
| <i>Legionella longbeachae</i> | |

Inne szczepy bakterii niż z gatunku *Legionella* zostały przygotowane na koncentrację zastosowania w roztworze

solnym o poziomie 3×10^8 CFU/mL i przebadane za pomocą testu NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Żaden z niżej wymienionych organizmów nie wchodzi w reakcję krzyżową z testem NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> |
| <i>Pseudomonas seruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |

c) Powtarzalność śródtestowa

Powtarzalność śródtestowa została ewaluowana poprzez badanie 10 replikatów z 4 rozcieńczeń próbek różnych stężeń *Legionella*. Wszystkie serie wykazały zbieżne i oczekiwane wyniki. Powtarzalność śródtestowa testu NADAL® Legionella Streptococcus pneumoniae wynosi 100%.

2. Streptokoki

a) Czułość i swoistość

Przeprowadzone zostały badania porównawcze pomiędzy szybkim testem BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae a testem NADAL® Legionella/S. pneumoniae, przy zastosowaniu panelu 16 świeżych próbek moczu i 42 magazynowanych próbek moczu.

Wyniki zostały przedstawione w poniższej tabeli:

| | | Szybki test BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae (metoda referencyjna) | | |
|--------------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------|------------|------|
| | | Pozytyw-ny | Negatyw-ny | Suma |
| Test NADAL® Legionella/S. pneumoniae | Pozytyw-ny | 26 | 4 | 30 |
| | Negatyw-ny | 7 | 21 | 28 |
| | Suma | 33 | 25 | 58 |

Z wyżej ukazanej tabeli wynika diagnostyczna czułość testu NADAL® Legionella/S. pneumoniae na poziomie 79% (26/33) oraz swoistość na poziomie 84% (21/25) w porównaniu do metody referencyjnej. Całkowita zgodność wynosi 81% (47/58) i jest zadowalająca, biorąc pod uwagę fakt, że długotrwałe przechowywanie 42 próbek (33 pozytywnych i 9 negatywnych) mogło spowodować rozkład antygeny *Streptococcus pneumoniae*.

b) Reakcja krzyżowa

Różne szczepy bakterii zostały przebadane przy pomocy testu NADAL® Legionella/S. pneumoniae, aby określić, czy mogą one powodować niespecyficzną reakcję (reakcję krzyżową).

Wyniki zostały przedstawione w poniższej tabeli:

| Grupa | Wynik |
|--------------------------------|-----------|
| Typy kapsulek Strep Pneumo (8) | Pozytywny |
| Strep-A, B, C, D, E, F, G & H | Negatywny |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> | Negatywny |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Negatywny |

c) Odtwarzalność wewnątrz-testowa

Odtwarzalność wewnątrz-testowa ewaluowana została poprzez przetestowanie 10 replikatów z 5 rozcieńczeń próbek różnych koncentracji *Streptococcus Pneumoniae*. Wszystkie serie wykazały zbieżne i oczekiwane wyniki. Odtwarzalność wewnątrz-testowa testu NADAL® Legionella/S. pneumoniae wynosi 100%.

14. Bibliografia

1. Edelstein, P.H. and Meyer, R.D., 'Legionella Pneumonias' In Respiratory infection: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New-York: Raven Press, Ltd. 1994.
2. Marston, B.J., Lipman, H.B. and Breiman, R.F. Arch. Intern. Med., 154, 2417-2422 (1994).
3. Horwitz, M.A., Marston, B.J., Broone, C.V. and Freiman, R.F. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology (1993).
4. Kohler, R. B. Winn, W.C. Jr and Wheat, L.J. J. Clin. Microbiol., 20, 605-607 (1984).
5. Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Christie, P., Johnston, F. and Edwards, G.F.S. J. Med. Microbiol., 53, 183-187 (2004).
6. Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. J. Clin. Microbiol., 38, 1709-1712.
7. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
8. CDC. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34): 1102-1106, 2010.
9. Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews, Microbiology, 6 (4) doi : 10.1038/nrmicro1871, 2008.
10. Robinson, K.A., Baughman, W., Rothrock, G. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998. Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA, 285: 1729-1735, 2001.
11. Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States. N. Engl. J. Med., 343: 1917-1924, 2000.
12. Tsai, C.J., Griffin, M.R., Nuorti, J.P. et al. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. Clin. Infect. Dis., 46 : 1664-1672, 2008.

Rev. 1, 2017-03-07 AM

1. Uso Previsto

O Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae é um imunoensaio cromatográfico rápido de fluxo lateral para a deteção qualitativa de antígenos de *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae* na urina humana. Este teste destina-se ao uso como auxílio no diagnóstico da infeção de *Legionella* (doença dos legionários), pneumonia, meningite e otite.

2. Introdução e Significado Clínico

A *Legionella* é uma bactéria gram-negativa associada à febre de Pontiac e à doença dos legionários levando à infeção do trato respiratório superior que, por conseguinte, causam a doença pulmonar (pneumonia). Têm-se registado muitos casos de febres altas.(1) Estima-se que nos EUA ocorrem anualmente cerca de 10.000 a 25.000 casos de infeções de *Legionella pneumophila*.(2, 3) Entre 5% a 30% das pessoas com a doença dos Legionários, acabam por morrer. As infeções extrapulmonares podem ser transmitidas através da corrente sanguínea ou do sistema linfático, infetando o coração, cérebro, rins, fígado e/ou o baço. Os métodos mais comuns para a deteção de *Legionella pneumophila* incluem uma cultura, o teste de imunofluorescência direta, de imunofluorescência indireta, imunoensaios enzimáticos e a reação em cadeia da polimerase.(5, 6) *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria gram-positiva isolada, pela primeira vez, por Pasteur em 1881 a partir da saliva de um paciente com raiva.(7) A estrutura química e a antigenicidade do polissacarídeo capsular do pneumococo, assim como a sua associação com o vírus e o seu papel nas doenças humanas, foram explicados durante o período entre 1915-1945. Estas bactérias são organismos anaeróbicos em forma de lanceta que se propagam pelo contato próximo de pessoa para pessoa através de gotículas respiratórias que causam doenças graves nos humanos: Estima-se que os 10 sorotipos mais comuns são os responsáveis por cerca de 62% de doenças invasivas em todo o mundo.(8) *Streptococcus pneumoniae* coloniza os tecidos do trato respiratório superior, causando pneumonias graves e dores leves/agudas de ouvidos/otites.(9) Os pneumococos causam entre 13% a 19% de todos os casos de meningite bacteriana nos Estados Unidos.(10) Um quarto dos pacientes com meningite pneumocócica também têm pneumonia. Os sintomas clínicos são geralmente semelhantes a outras formas de meningite bacteriana purulenta e incluem dor de cabeça, letargia, vômitos, irritabilidade, febre, rigidez de nuca, sinais cranianos, convulsões e coma. A letalidade da meningite pneumocócica é de cerca de 30%, mas pode ser tão elevada quanto 80% nos idosos. A pneumonia bacteriana é responsável por 12-16% da doença pneumocócica invasiva em crianças de 2 anos ou até mesmo mais novas, o que revela que a *S. pneumoniae* tornou-se a principal causa de meningite bacteriana em crianças com menos de 5 anos de idade nos Estados Unidos. O tratamento com antibióticos é eficaz mesmo com estirpes identificadas como resistentes à penicilina. (11) Existem várias vacinas disponíveis, com diferentes valores de eficiência, dependendo das características do paciente, tais como a idade, doenças crónicas ou imunodeficiência. No entanto, as vacinas tem demonstrado proporcionar proteção contra a pneumonia pneumocócica. (12)

3. Princípio do Teste

O Teste cassete NADAL® Legionella/S. pneumoniae contém duas tiras internas diferentes para a deteção de *Legionella* e *Streptococcus*. Os anticorpos monoclonais de *Legionella* e *Streptococcus* coloridos, conjugados com ouro coloidal, estão colocados na respectiva almofada de conjugado de cada membrana. Algumas gotas da amostra de urina devem ser distribuídas por cada poço da amostra (⇨) do teste cassete. À medida que a amostra flui ao longo da membrana, o anticorpo conjugado marcado liga-se aos antígenos da *Legionella* e de *Streptococcus* (quando presente na amostra) e formam complexos anticorpo-antígeno. Estes complexos ligam-se aos anticorpos policlonais de *Legionella* ou *Streptococcus* na região da linha de teste (T) do teste cassete, formando uma linha cor-de-rosa. Na ausência de *Legionella* ou *Streptococcus*, não devem aparecer linhas na região da linha de teste (T). A mistura de reação continua a migrar ao longo das membranas, até alcançar a região de controlo (C). Outros conjugados de anticorpos unem-se aos reagentes na região da linha de controlo (C), formando linhas cor-de-rosa. A linha de controlo deve aparecer sempre em cada região da linha de controlo (C), independentemente da presença ou ausência da linha de teste, indicando que o volume da amostra adicionado foi o apropriado e que a absorção da membrana ocorreu adequadamente.

4. Reagentes e Material Fornecido

- 10 testes cassete NADAL® Legionella/S. pneumoniae (incluindo pipetas descartáveis)
- 1 manual de utilização

5. Materiais Adicionais Necessários

- Cronómetro
- Recipiente para recolha da amostra

6. Conservação & Armazenamento

Manter o teste armazenado no interior da sua embalagem de alumínio selado a 4-30°C. Não congelar o kit de teste. O teste cassete encontra-se estável até à data de validade indicada na embalagem selada.

7. Advertências e Precauções

- Apenas para utilização profissional de diagnóstico *in-vitro*.
- Leia o folheto cuidadosamente antes da realização do teste.
- Não utilizar após o prazo validade.
- Use somente amostras de urina.
- Não reutilizar os testes.
- Não utilizar caso a embalagem se encontre danificada.
- Não comer, beber ou fumar na área de manuseamento de amostras e kits de testes.
- Manusear todas as amostras como potenciais agentes infecciosos.
- Observar as regulamentações estabelecidas respeitantes a riscos microbiológicos ao tratamento de resíduos durante todos os procedimentos.
- Utilizar vestuário de proteção como batas, luvas descartáveis e proteção ocular quando manusear amostras.
- Materiais de testes usados devem ser eliminados de acordo com as regulamentações locais.
- Humidade e temperatura podem afetar negativamente os resultados do teste.

8. Preparação e Recolha da Amostra

Recolher uma amostra de urina num recipiente limpo que não contenha restos de detergente. Para uma melhor avaliação, a primeira amostra de urina da manhã é a preferida, uma vez que esta amostra pode conter a maior concentração de bactérias. Se não realizar o teste imediatamente, coloque a amostra no frio (2-8°C) durante 24 horas no máximo. Nesse caso, a amostra deve atingir a temperatura ambiente antes de realizar o teste. Se a análise for adiada por mais de 24 horas, as amostras devem ser congeladas. Uma amostra congelada deve ser completamente descongelada, misturando-a cuidadosamente até atingir a temperatura ambiente antes da realização efetiva do teste. Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos das amostras.

9. Procedimento do Teste

1. Garantir que todos os componentes do teste e as amostras estão à temperatura ambiente.
2. Retirar o teste cassete da embalagem selada.
3. Etiquetar o teste cassete com a identificação do paciente ou o número de controlo.
4. Encher a pipeta com a urina. Segurar verticalmente, adicionar 3 gotas de urina a cada poço de amostra (⇨).
5. Interpretar os resultados após 10 minutos. Não interpretar os resultados após decorridos mais de 15 minutos.



10. Interpretação dos Resultados

Positivo para *Legionella pneumophila*:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo (C) e uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de teste (T) para *Legionella pneumophila* (LEGIO).



Positivo para *Streptococcus pneumoniae*:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo (C) e uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de teste (T) para *Streptococcus pneumoniae* (S.PNEU).



Positivo para *Legionella pneumophila* e para *Streptococcus pneumoniae*:

Além das linhas de controlo (C), uma linha colorida desenvolve-se em cada região da linha de teste para *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*.



Negativo:

Uma linha colorida surge na região da linha de controlo (C). Nenhuma linha colorida surge da região da linha de teste (T).



Invlálido:

As linhas de controlo não se desenvolvem. Resultados de qualquer teste no qual não tenha surgido uma



linha de controlo no tempo de leitura especificado não deverão ser considerados.

As razões mais prováveis para um resultado inválido são o volume da amostra, erros procedurais ou testes expirados. Por favor, rever o procedimento e repetir o teste com um novo teste cassete. Se o problema persistir, interromper a utilização do kit e contactar o distribuidor.

11. Controlo de Qualidade

Um controlo interno de procedimento encontra-se incluído no teste cassete:

A linha colorida que surge na região da linha de controlo (C), é considerada um controlo interno de procedimento. Isto confirma um volume de amostra suficiente, uma saturação de membrana adequada e o procedimento técnico correto.

12. Limitações

- O teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae foi concebido para detetar antígenos de *Legionella* ou *Streptococcus* em amostras de urina humana. Um resultado antígeno negativo não exclui a possibilidade de infeção por *Legionella pneumophila*. A concentração de antígeno pode encontrar-se abaixo do nível de deteção do teste. Recomenda-se que a cultura seja usada por pacientes com suspeita de pneumonia para detetar a presença de outros agentes diferentes à *Legionella pneumophila*.
- Se um resultado falso positivo é suspeito (ou seja resultado positivo, sem quaisquer sinais clínicos da doença), o ensaio deve ser repetido na mesma amostra de urina após ser aquecida durante 5 minutos a 100°C para desnaturar as proteínas na urina sem afetar os antígenos da *Legionella*.
- Os resultados falsos positivos podem ser obtidos por pacientes que tenham sido tratados com injeção de soro de coelho com anti-linfócitos. Estes anticorpos anti-linfócitos podem ser eliminados por aquecimento da amostra de urina sem afetar os antígenos de *Legionella* (tal como descrito no ponto anterior).
- O teste fornece um diagnóstico presuntivo de infeção por *Legionella pneumophila*. No entanto, esta constatação não deve apenas basear-se em evidências clínicas e radiológicas. A fim de realizar um diagnóstico preciso, os resultados da cultura, as provas sorológicas e os métodos de deteção de antígenos devem ser usados em conjunto com os resultados clínicos.
- Os imunoenaios sensíveis podem demonstrar resultados positivos com amostras contendo anticorpos heterófilos. Se a interpretação qualitativa é inconsistente com os resultados clínicos, devem ser realizados outros testes como alternativa.
- A excreção de antígenos de *Legionella* pode ser observada após três dias do aparecimento dos sintomas. No entanto, os antígenos podem continuar a ser excretados até um ano mais tarde. Um resultado positivo com o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae pode ocorrer durante uma infeção atual ou do passado.
- O Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae não diferencia indivíduos colonizados de infetados.
- O Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae não distingue entre as diferentes infeções pneumocócicas potencialmente

induzidas por *Streptococcus pneumoniae*. A fim de realizar um diagnóstico preciso, os resultados da cultura, as provas sorológicas e os métodos de deteção de antígenos devem ser usados em conjunto com os resultados clínicos.

- Tal como acontece com quaisquer outros procedimentos de diagnóstico, o médico deve avaliar os dados obtidos com este teste à luz das outras informações clínicas.

13. Características de Desempenho

1. Legionella

a) Sensibilidade Especificidade

Um estudo comparativo entre o teste rápido BinaxNOW® Legionella e o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae foi realizado utilizando um painel de 48 amostras de urina humana.

Os resultados encontra-se figurados na seguinte tabela:

| | | Teste rápido BinaxNOW® Legionella (método de referência) | | |
|---------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae | Positivo | 8 | 0 | 8 |
| | Negativo | 0 | 40 | 40 |
| | Total | 8 | 40 | 48 |

Como se pode observar na tabela acima, a sensibilidade do Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae é 100% (8/8) e a sua especificidade é de 100% (40/40), quando comparado com o método de referência. A concordância global é de 100% (48/48).

b) Reação Cruzada

As estirpes de *Legionella* listadas abaixo foram cultivadas e preparadas para uma concentração de trabalho de 1 x 10⁸ CFU/mL em solução salina. Cada estirpe de ensaio foi executada com o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Nenhum dos organismos listados abaixo reagiu de forma cruzada com o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 2-14 | <i>Legionella anisa</i> |
| <i>Legionella bozemanii</i> | <i>Legionella dumoffii</i> |
| <i>Legionella feeleii</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella hackeliae</i> | <i>Legionella micdadei</i> |
| <i>Legionella longbeachae</i> | |

Estirpes de bactérias que não sejam do género *Legionella* foram preparadas para uma concentração de 3 x 10⁸ CFU/mL em solução salina e executadas com o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae. Nenhum dos organismos listados abaixo reagiu de forma cruzada com o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae.

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> |
| <i>Pseudomonas seruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |

c) Reprodutibilidade intra-ensaio

A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada através de 10 repetições de 4 diluições de amostras com diferentes concentrações de *Legionella*. Todas as séries mostraram resultados convergentes e esperados. A reprodutibilidade intra-lote do teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae é de 100%.

2. Streptococcus

a) Sensibilidade e Especificidade

Um estudo comparativo entre o teste rápido BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae e o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae foi realizado utilizando um painel de 16 amostras de urina frescas e 42 amostras de urina armazenadas.

Os resultados encontra-se figurados na seguinte tabela:

| | | Teste rápido BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae (método de referência) | | |
|---------------------------------------|----------|------------------------------------------------------------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae | Positivo | 26 | 4 | 30 |
| | Negativo | 7 | 21 | 28 |
| | Total | 33 | 25 | 58 |

Como se pode observar na tabela acima, a sensibilidade do Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae é 79% (26/33) e a sua especificidade é de 84% (21/25), quando comparado com o método de referência. A concordância geral é de 81% (47/58) e satisfatória apesar de que um longo armazenamento das 42 amostras (33 positivas e 9 negativas) poderia ter causado a degradação de antígenos de *Streptococcus pneumoniae*.

b) Reação Cruzada

Diferentes estirpes de bactérias foram testadas usando o Teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae, a fim de determinar se podem causar uma reação não específica (reações cruzadas).

Os resultados encontram-se na seguinte tabela:

| Grupo | Resultado |
|-----------------------------------|-----------|
| Strep-Pneumo tipos capsulares (8) | Positivo |
| Strep-A, B, C, D, E, F, G & H | Negativo |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> | Negativo |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Negativo |


c) Reprodutibilidade intra-ensaio











A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada através de 10 repetições de 5 diluições de amostras com diferentes concentrações de *Streptococcus Pneumoniae*. Todas as séries mostraram resultados convergentes e esperados. A reprodutibilidade intra-lote do teste NADAL® Legionella/S. pneumoniae é de 100%.

14. Referências

1. Edelstein, P.H. and Meyer, R.D., 'Legionella Pneumonias' In Respiratory infection: Diagnosis and Management, 3rd Edition, James E. Pennington, editor. New-York: Raven Press, Ltd. 1994.
2. Marston, B.J., Lipman, H.B. and Breiman, R.F. Arch. Intern. Med., 154, 2417-2422 (1994).
3. Horwitz, M.A., Marston, B.J., Broone, C.V. and Freiman, R.F. Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P., eds. Legionella: Current status and emerging perspectives. Washington, DC American Society for Microbiology (1993).
4. Kohler, R. B. Winn, W.C. Jr and Wheat, L.J. J. Clin. Microbiol., 20, 605-607 (1984).
5. Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Christie, P., Johnston, F. and Edwards, G.F.S. J. Med. Microbiol., 53, 183-187 (2004).
6. Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. J. Clin. Microbiol., 38, 1709-1712 .
7. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
8. CDC. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34): 1102-1106, 2010.
9. Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews, Microbiology, 6 (4) doi : 10.1038/nrmicro1871, 2008.
10. Robinson, K.A., Baughman, W., Rothrock, G. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998. Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. JAMA, 285: 1729-1735, 2001.
11. Whitney, C.G., Farley, M.M., Hadler, J. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States. N. Engl. J. Med., 343: 1917-1924, 2000.
12. Tsai, C.J., Griffin, M.R., Nuorti, J.P. et al. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. Clin. Infect. Dis., 46 : 1664-1672, 2008.

Rev. 1, 2017-03-07 AL

| Symbol | Deutsch | English | Français | Español | Italiano | Polski |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|
|  | CE Konformitätszeichen | CE marking of conformity | Conforme aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea | Znak zgodności CE |
|  | Gebrauchsanweisung beachten | Consult instructions for use | Consulter la notice d'utilisation | Consúltense las instrucciones de uso | Consultare le istruzioni per l'uso | Przestrzegać instrukcji obsługi |
|  | <i>in-vitro</i> -Diagnostika | <i>in-vitro</i> diagnostic medical device | Dispositif médical de diagnostic <i>in-vitro</i> | Producto sanitario para diagnóstico <i>in-vitro</i> | Dispositivo medico-diagnostico <i>in-vitro</i> | Tylko do diagnostyki <i>in-vitro</i> |
|  | Temperaturbegrenzung | Temperature limitation | Limites de température | Limite de temperatura | Limiti di temperatura | Temperatura przechowywania |
|  | Chargenbezeichnung | Batch code | Numéro de lot | Código de lote | Codice lotto | Numer serii |
|  | Nicht zur Wiederverwendung | Do not reuse | Ne pas réutiliser | No reutilizar | Non riutilizzare | Tylko do jednorazowego użytku |
|  | Verwendbar bis | Use by | Utiliser jusqu'au | Fecha de caducidad | Utilizzare entro | Data ważności |
|  | Bestellnummer | Catalogue Number | Référence du catalogue | Número de catálogo | Riferimento di Catalogo | Numer katalogowy |
|  | Hersteller | Manufacturer | Fabricant | Fabricante | Fabbricante | Producent |
|  | Ausreichend für <n> Ansätze | Sufficient for <n> tests | Suffisant pour "n" tests | Suficiente para <n> utilizaciones | Sufficiente per "n" saggi | Wystarczający na <n> Powtórzeń |

| Symbol | Português | Český | Suomi | Svenskt | Nederlands | Dansk | Norsk |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|  | Conformidade com as normas europeias | CE certifikát | CE-merkitty | CE-märkning | CE-markering | CE-mærkning | CE standardisert |
|  | Consultar as instruções de utilização | Viz návod k použití | Katso käyttöohjetta | Läs bruksanvisningen | Raadpleeg de gebruiksaanwijzing | Se brugsanvisningen | Les bruksanvisning nøye |
|  | Dispositivo médico para diagnóstico <i>in-vitro</i> | Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in-vitro</i> | <i>in-vitro</i> - diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite | Medicinteknisk produkt avsedd för <i>in-vitro</i> -diagnostik | Medisch hulpmiddel voor <i>in-vitro</i> diagnostiek | Medicinsk udstyr til <i>in-vitro</i> -diagnostik | <i>in-vitro</i> diagnostic medisinsk enhet |
|  | Limites de temperatura | Teplotní omezení | Lämpötilarajat | Temperaturbegränsning | Temperatuurlimiet | Temperaturbegrænsning | Temperaturbegrensning |
|  | Código do lote | Kód šarže | Eräkoodi | Satsnummer | Code van de partij | Batchkode | Merking |
|  | Não reutilizar | Pro jednorázové použití | Kertakäyttöinen | Får inte återanvändas | Niet opnieuw gebruiken | Må ikke genbruges | Må ikke brukes om igjen |
|  | Prazo de validade | Spotřebuje do | Käytettävä viimeistään | Används före | Houdbaar tot | Udløbsdato | Tidtaking |
|  | Número de catálogo | Katalogov číslo | Luettelonumero | Listnummer | Catalogus nummer | Best il l ingsnummer | Katalog nummer |
|  | Fabricante | Výrobce | Valmistaja | Tillverkare | Fabrikant | Fabrikant | Produsent |
|  | Suficiente para <n> test | Dostačuje pro <n> testů | Lukumäärä <n> test | Räcker till <n> test | Voldoende voor <n> test | Tilstrækkeligt til <n> test | Tilstrækkelig for <n> tester |

Our Teams

Germany:

Regensburg

Tel: +49 941 290 10-0
Fax: +49 941 290 10-50

Moers

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

Austria:

Tel: +49 941 290 10-29
Free Tel: 0800 291 565
Fax: +49 290 10-50
Free Fax: 0800 298 197

UK & Ireland:

Tel: +49 941 290 10-18
Free Tel – UK: 0808 234 1237
Free Tel – IRE: 1800 555 080
Fax: +49 290 10-50

France:

France Tel: 0800 915 240
France Fax: 0800 909 493

Switzerland

Swiss Tel: 0800 564 720
Swiss Fax: 0800 837 476

Belgium

Belgium Tel: 0800 718 82
Belgium Fax: 0800 747 07

Luxembourg

Lux. Tel: 800 211 16
Lux. Fax: 800 261 79

Spain:

Tel: +49 941 290 10-759
Free Tel: 900 938 315
Fax: +49 941 290 10-50
Free Fax: 900 984 992

Italy:

Tel: +49 941 290 10-34
Fax: +49 941 290 10-50

Poland:

Tel: +49 941 290 10-44
Free Tel: 00 800 491 15 95
Fax: +49 941 290 10-50
Free Fax: 00 800 491 15 94

Portugal:

Tel: +49 941 290 10-735
Tel. Verde: 800 849 230
Fax: +49 941 290 10-50
Fax Verde: 800 849 229

Netherlands:

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

Nordic countries (Finland, Norway, Sweden, Denmark):

Tel: +31 703075 607
Free Tel: +45 80 88 87 53
Tax: +31 703030 775

Laboratory Diagnostics Team:

Tel: +49 941 290 10-40
Fax: +49 941 290 10-50



nal von minden GmbH

Carl-Zeiss-Strasse 12 • 47445 Moers • Germany
www.nal-vonminden.com • info@nal-vonminden.com
Fon: +49 2841 99820-0 • Fax: +49 2841 99820-1