

NOW[®] Legionella

Test přítomnosti antigenu v moči

POUŽITÍ

Binax NOW[®] Legionella TEST je rychlá *in vitro* imunochromatografická metoda pro kvalitativní stanovení Legionella pneumophila sérotyp 1 v moči pacientů s příznaky pneumonie. Ve spojení s kultivací a dalšími metodami je pomůckou k určení předpokládané diagnózy Legionellové infekce (tzv. Legionářské nemoci) způsobené Legionella pneumophila sérotyp 1.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ TESTU

V roce 1976 vypuklo na sjezdu amerických Legionářů ve Philadelphii akutní horečnaté respirační onemocnění v rozpětí od lehkého onemocnění k fatální pneumonii¹. Bylo nazváno Legionářská nemoc a je způsobena mikroorganizmem Legionella pneumophila. Nemoc se vyskytuje v epidemické i endemické formě a sporadické případy nejsou rozpoznatelné od ostatních respiračních onemocnění jen podle klinických příznaků. Ročně je zaznamenáno asi 25 000⁽²⁾ až 100 000⁽³⁾ případů infekce Legionellou v USA s mortalitou od 25% do 40%⁽²⁾. Mortalita může být snížena správnou a rychlou diagnostikou a následnou antimikrobiální terapií. Známými rizikovými faktory jsou imunosuprese, kouření, konzumace alkoholu a průvodní pulmonální nemoci⁽²⁾. Mládež a starší lidé jsou k nemoci vnímavější⁽⁴⁻⁶⁾.

Legionella pneumophila je zodpovědná za 80 – 90% nahlášených případů legionelových infekcí. Legionella pneumophila sérotyp 1 způsobuje více než 70% těchto legionelóz^{2,7,8}. Současné metody pro laboratorní stanovení pneumonií způsobených Legionella pneumophila vyžadují pro přesnou diagnózu vzorek z dýchacích cest (sputum, bronchiální výplach, transtracheální aspirát, plicní biopsii) nebo dvojici vzorků séra (sérum pacienta v akutní fázi a druhý vzorek pokud se pacient již zotavuje). Tyto techniky zahrnují legionelovou kulturu, přímou fluorescenční protilátku, DNA probu a nepřímou fluorescenční protilátku. Všechny tyto metody vyžadují adekvátní množství vzorku nebo sbírání séra po dvou nebo šesti týdnech. Omezením je to, že jedním z příznaků legionářské nemoci je nedostatečná produkce sputa^{8,9}. U mnoha pacientů je potřeba použít invazivní metody pro získání vzorku. Sérologická diagnóza je obvykle svou podstatou retrospektivní, ale i tak je spolupráce pacientů při získávání nezbytných vzorků špatná.

Binax NOW[®] Legionella TEST poskytuje rychlou diagnózu Legionella pneumophila sérotyp 1. Detekuje specifický rozpustný antigen vylučovaný v moči pacientů s legionářskou nemocí¹⁰⁻¹⁴. Legionella pneumophila sérotyp 1 antigen byl detekován u pacienta již po třech dnech po prvních příznacích¹⁵. Test je rychlý a dává výsledky během 15 minut. Hlavní výhodou je, že používá jako vzorek moč, která je pohodlně dosažitelná a transportovatelná a antigen je v ní prezentován v časně i pozdní fázi nemoci¹⁵.

PRINCIPIY STANOVENÍ

KONTROLNÍ LINIE

VZORKOVÁ LINIE



Binax NOW[®] Legionella TEST je imunochromatografické stanovení na membráně určené k detekci antigenu Legionella pneumophila sérotyp 1 rozpustného v moči. Používá králičí anti-Legionella pneumophila sérotyp 1 protilátku, která je imobilizována na nitroceluloseové membráně ve vzorkové linii. Kozí protilátka proti králičí IgG je imobilizována na stejnou membránu na kontrolní linii (viz obr.). Králičí anti-Legionella pneumophila sérotyp 1 protilátka je konjugována. Konjugát je vysušen na inertním vláknitém nosiči. Ten spolu s membránou vytváří testovací proužek. Výsledná konjugátová podložka a membrána vytváří testovací proužek. Testovací proužek a část pro zasunutí tamponu jsou umístěny na opačných stranách testovací kazety.

Při provedení testu je tampon namočen ve vzorku moči, vyjmut a po té vložen do testovací kazety. Z kapací lahvičky je přidán Reagent A a systém je poté uzavřen. Uzavřením kazety je vzorek nanesen na testovací proužek. Legionella pneumophila sérotyp 1 antigen z moče je vázán na imobilizovanou anti-Legionella pneumophila sérotyp 1 protilátkou reagující s konjugovanou protilátkou. Po této reakci se objeví proužek ve vzorkové linii. Imobilizovaná kozí protilátka proti králičí IgG zajistí vizualizaci konjugátu v kontrolní linii. Pozitivní výsledek je vyhodnotitelný do 15 minut v závislosti na koncentraci antigenu. Negativní výsledek je vyhodnotitelný za 15 minut a indikuje, že Legionella pneumophila sérotyp 1 antigen není v moči pacienta přítomen.

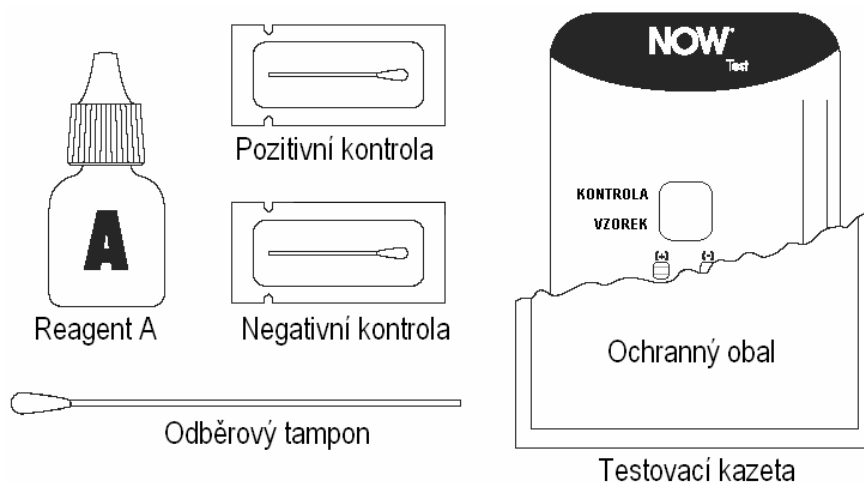
Test je hodnocen na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti detekčního růžovo-červeného proužku. Pozitivní výsledek zahrnuje detekci pacientova i kontrolního vzorku, negativní výsledek je prezentován pouze kontrolní linií. Selhání kontrolní linie ukazuje na chybný nebo špatně provedený test.

REAGENCIE A MATERIÁL

POSKYTOVANÝ MATERIÁL

Binax NOW[®] Legionella TEST

- Testovací kazeta s membránou (potaženou králičími protilátkami specifickými proti Legionella pneumophila sérotyp 1 a kozí protilátka proti králičí IgG) a konjugátovou podložkou (s konjugátem králičích protilátek specifických proti Legionella pneumophila sérotyp 1).
- Reagent A – citrát/fosfát, Tween 20, azid sodný.
- Tampony – určené pro použití Binax NOW[®] Legionella TEST.
- **Nepoužívejte jiné tampony.**
- Pozitivní kontrola – tampon s teplem inaktivovanou Legionella pneumophila. Negativní kontrola – tampon bez Legionella pneumophila.



Příslušenství které je možné objednat

- 5 tamponů pozitivních
- 5 tamponů negativních

NEPOSKYTOVANÝ MATERIÁL

- Stopky nebo budík
- Odběrové nádoby na moč

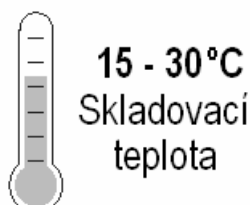
PREVENCE

Chybné výsledky, vzniklé nepřítomností kontrolní linie se mohou vyskytnout, pokud nepoužijete dostatečné množství Regentu A. Pro zaručení správného objemu Regentu A, vždy držte lahvičku svisle asi 2 cm nad jamkou s tamponem. Přidávejte kapky pozvolna.

1. Test je určen pro *in vitro* diagnostické testy.
2. Kazeta je zalepena v ochranné folii. Nepoužívejte kazety, které mají poškozený obal. Nedotýkejte se reakční jamky na testovací kazetě.
3. Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby expirace
4. Nemíchejte reagentie a materiál různých šarží.
5. Tampony v kitu jsou prověřené pro použití testů Binax NOW[®] Legionella TEST, nepoužívejte proto jiné tampony.
6. Roztoky používané k výrobě kontrol jsou inaktivovány použitím standardních metod. Zacházejte s pacientovým vzorkem, kontrolami i testovými kazetami jako s potenciálně infekčním materiálem a dodržujte hygienu práce.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Skladujte soupravu při laboratorní teplotě (15-30°C). Reagencie Binax NOW[®] Legionella TESTu jsou stabilní do doby expirace vyznačené na obalu. Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby expirace.



SBĚR VZORKU

Na sběr moči mohou být použity standardní sběrné nádoby. Vzorky moči mohou být skladovány 24 hodin při laboratorní teplotě, 14 dnů při 2-8°C v lednici nebo při -10°C až -20°C i delší dobu před testováním.

Můžete přidat kyselinu boritou jako konzervační činidlo.

Pokud je to nezbytné, může být moč přepravována v nerozbitných kontejnerech při 2-8°C nebo zmražená.

Před testováním, však musí být všechny vzorky vytemperovány na laboratorní teplotu.

KONTROLA KVALITY

Denní kontrola kvality

Binax NOW[®] Legionella TEST obsahuje kontrolu v každé kazetě. Doporučení výrobce pro denní kontrolu kvality je dokumentovat tyto kontroly pro každý vzorek.

Pozitivní kontrola

Růžovo-červenou kontrolní linii můžeme považovat za vnitřní kontrolu. Pokud se k němu kapilární proud dostane, pokaždé se objeví

Negativní kontrola

K vyčištění pozadí ve výsledkovém okně, které může být světle růžové, dojde do 15-ti minut. Pozadí by nemělo interferovat při vyhodnocení výsledku.

Externí pozitivní a negativní kontrola

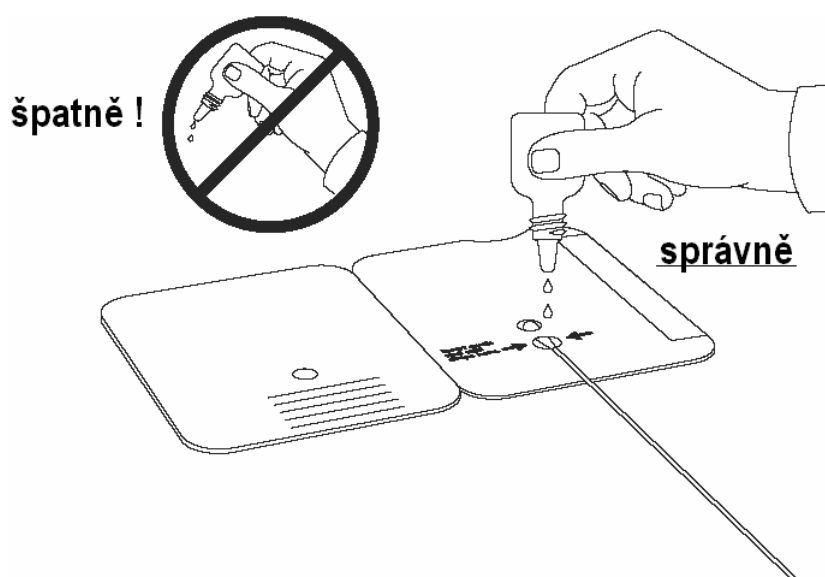
Zásady dobré laboratorní praxe doporučují používat pozitivní a negativní kontroly k ověření funkčnosti reagentů a správného zobrazení výsledku metody. Pozitivní a negativní kontrolní tampony jsou součástí každé soupravy a kontrolují celý proces stanovení. Další pozitivní a negativní tampony je možné získat zvlášť. Při použití tekutých močových kontrol postupujte jednoduše tak, jako by jste postupovali s pacientovými vzorky.

Pozitivní a negativní vzorky testujte vždy když otevřete novou soupravou v rámci běžné laboratorní kontroly. Pokud nedojde k správným výsledkům kontrol, netestujte vzorek od pacienta a kontaktujte distributora.

STANOVENÍ

Neodstraňujte ochrannou folii z kazety dokud vzorek nedosáhne laboratorní teploty.

1. Přineste pacientův vzorek do laboratorní teploty (15-30 °C) a těsně před testováním odstraňte ochrannou folii. Kazetu položte na stůl vodorovně.
2. Ponořte Binax tampon do testovaného vzorku moče. Tampon musí být ponořen celý. Před vyndáním tamponu se dotkněte tamponem stěny nádoby aby jste odstranili přebytečnou moč.
3. Zasuňte Binax tampon do spodní jamky tak, aby byl celý vidět v horní jamce.
4. Z kapací lahvičky z výšky asi 1-2 cm kápněte **2** kapky Reagentu A do spodní jamky.
5. Odstraňte adhezivní pásku na pravé straně testovací kazety a zavřete kazetu. Výsledek hodnotíte po 15 min.

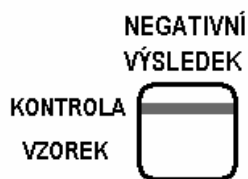


Poznámka: Po zavření destičky se může stát, že se poruší oblast jamek ve kterém drží tampon. Dejte pozor, aby tampon zůstal po dobu 15 minut fixován v původní poloze.

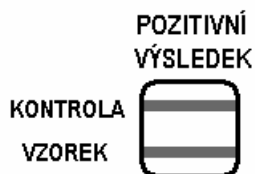
Postup při použití kontrolních tamponů:

1. Zasuňte kontrolní tampon do spodní jamky, tak aby byl celý vidět v horní jamce.
2. Z kapací lahvičky z výšky asi 1-2 cm kápněte **6** kapek Reagentu A do spodní jamky.
3. Odstraňte adhezivní pásku na pravé straně testovací kazety a zavřete kazetu. Výsledek přečtete po 15 min.

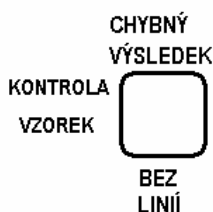
INTERPRETACE VÝSLEDKŮ



Negativní výsledek dává jednu růžovo-červenou kontrolní linii horní části okénka. To znamená, že test je negativní, proběhl správně a moč neobsahuje antigen *L. pneumophila* sérotyp 1.



Pozitivní výsledek dává dvě růžovo-červené linie. Jednu kontrolní v horní části okénka a jednu v dolní části, která znamená přítomnost antigenu *L. pneumophila* sérotyp 1. Vzorky moči se slabší pozitivitou dávají slabší linie, ale **každá i slabá vzorková linie je považována za pozitivní výsledek.**



Chybný výsledek - pokud se neobjeví žádná linie nebo se objeví jen linie v dolní části okénka je test chybný a měl by být opakován.

Pozitivní výsledek: předpokládaný pozitivní výsledek pro *Legionella pneumophila* sérotyp 1 v moči naznačuje současné nebo proběhlé onemocnění.

Negativní výsledek: předpokládaný negativní výsledek pro *Legionella pneumophila* sérotyp 1 v moči naznačuje že neprobíhá onemocnění způsobené *Legionella pneumophila* sérotyp 1. Nevylučuje však onemocnění jinými sérotypy *Legionella* nebo počátek onemocnění, kdy není antigen v moči ještě prezentován nebo hladina ještě nepřestoupila prahové hodnoty testu.

OMEZENÍ

Binax NOW[®] *Legionella* TEST je použitelný pouze pro vzorky moči. Jiné vzorky (sérum, plasma, voda) nebudou vyhodnoceny.

Tento test nevyhodnocuje přítomnost jiných sérotypů *Legionella pneumophila* a dalších *Legionella* sp. Při podezření na pneumonii je doporučena kultivace k vyloučení jiných infekčních agens.

Diagnóza Legionářských nemocí nemůže být založena jen na klinických příznacích a radiologickém nález. Neexistuje uspokojující test pro diagnostiku Legionářské nemoci. Každopádně kultivace, sérologické testy, detekce antigenu v moči a klinické nálezy mohou přispět k přesné diagnóze.

Vylučování antigenu *Legionella* závisí individuálně na každém pacientovi. Obvykle se antigen prezentuje nejdříve 3 dny po prvních příznacích a persistuje až 1 rok po onemocnění. Pozitivní test tedy může znamenat současné nebo prodělané onemocnění.

Test provedený na diuretické moči nebude vyhodnocen.

Hodnocení Binax NOW[®] Legionella TESTu bylo jen na hospitalizovaných pacientech. Test nebyl zkoušen na ambulantních pacientech.

INTERPRETACE DAT

Klinická citlivost a přesnost (retrospektivní studie) (Sensitivity)

Binax NOW[®] Legionella TEST byl ověřen na 300 zmrazených vzorcích moče. Sto těchto vzorků bylo pozitivní na Legionella pneumophila sérotyp 1 podle kultivace, DFA, RIA nebo IFA.

Celková korelace NOW[®] testu a ostatních laboratorních metod byla 95%.

	Laboratorní diagnóza	
	pozitivní	negativní
NOW [®] pozitivní	95	10
NOW [®] negativní	5	190

Citlivost	95 %	(88,7 %-98,4 %)
Přesnost	95 %	(91,0 %-97,6 %)
Správnost	95 %	(91,9 %-97,2 %)

Klinická přesnost (prospektivní studie)

Ve studii provedené na vzorcích hospitalizovaných pacientů s příznaky onemocnění dolních cest dýchacích nebo sepsí bylo provedeno testování 93 čerstvých vzorků moči. 100% těchto předpokládaně negativních vzorků bylo Binax NOW[®] Legionella TESTem určena jako negativní.

Cross-reaktivita

Z 200 negativních vzorků, které byly testovány, bylo 85 od pacientů s jinou než Legionellovou bakterémií, 84 s infekcí močových cest, 14 s mykobakteriální infekcí, 5 s empyemem, 11 s jinými plicními potížemi a 1 s pneumonií způsobenou transtracheálním aspirátem.

Z těchto 200 vzorků testovaných Binax NOW[®] Legionella TESTem bylo 190 negativních.

Reprodukovatelnost

Slepá studie Binax NOW[®] Legionella TESTu byla provedena na třech oddělených pracovištích za použití panelu kódovaných vzorků. Panel obsahoval negativní, slabě pozitivní, středně pozitivní a silně pozitivní vzorky. Vzorky byly testovány jak s kyselinou boritou tak bez ní. Každý vzorek byl testován v několika cyklech a 629 vzorků z celkových 630 dalo očekávaný výsledek.

CITACE

- 1) Fraser, D.W., T.R. Tsai, W. Orensein, W.E. Parkin, P.H., H.J. Beecham, R.G. Sharrar, J. Harris, G.F. Mallison, S. M. Martin, J.E. McDade, C.C. Shepard, P.S. Brachman, and The Field Investigation Team. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N. Engl. J. Med. 1977;297:1189-1197.
- 2) Marston, B.J., H.B. Lipman, R. F. Breiman. Surveillance for Legionnaires' Disease: risk factors for morbidity and mortality. Arch. Intern. Med. 1994;154:2417-2422.

- 3) Horwitz, M. A., B.J. Marston, C.V. Broome, and R.F. Breiman. Prospects for vaccine development. Presented at the 4th International Symposium on Legionella, 1992. In: Barbaree, J. M., R.F. Breiman, and A. P. DuFour, eds. Legionella: Current Status and Emerging Perspectives. Washington, D.C. American Society for Microbiology, 1993.
- 4) Kohler, R.B. Antigen detection for the rapid diagnosis of Mycoplasma and Legionella pneumonia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1988;4:47S-59S.
- 5) Roig, J., X. Aquiler, J. Ruiz, et. al. Comparative study of Legionella pneumophila and other nosocomial-acquired pneumoniaes. Chest. 1991;99:344-50.
- 6) Carretala, J., F. Gudiol, R. Pelleres, et. al. Risk factors for nosocomial Legionella pneumophila pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Med. 1994;149:625-9.
- 7) Reingold, A.L., B.M. Thomason, B.J. Brake, L. Thacker, H.W. Wilkinson, and J.N. Kuritsky. Legionella pneumonia in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness. J. Infect. Dis. 1984;149:819.
- 8) Stout, J.E., V.L. Yu. Legionellosis. New Eng. J. of Medicine. 1997;337:682-7.
- 9) Edelstein, P.H. Legionnaires' Disease. Clinical Infectious Diseases. 1993;16:741-9.
- 10) Berdal, B.P., C.E. Farshy, and J.C. Feeley. Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. J. Clin. Microbiol. 1979;9:575-578.
- 11) Tilton, R.C. Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Ann. Intern. Med. 1979;90:697-698.
- 12) Kohler, R.B., S.E. Zimmerman, E. Wilson, S.D. Allen, P.H. Edelstein, L.J. Wheat, and White. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' Disease. Ann. Intern. Med. 1981;94:601-605.
- 13) Bibb, W.F., P.M. Arnow, L. Thacker, and R.M. McKinney. Detection of soluble Legionella pneumophila antigens in serum and urine specimens by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 1984;20:478-482.
- 14) Tang, P.W., and S. Toma. Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Legionella soluble antigens. J. Clin. Microbiol. 1986;24:556-558.
- 15) Kohler, R.B., W.C. Winn, Jr., and L.J. Wheat. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. J. Clin. Microbiol. 1984;20:605-607.

OBJEDNACÍ KATALOGOVÁ ČÍSLA

852-000 Binax NOW[®] Legionella TEST (22 testů v soupravě)
852-012 Binax NOW[®] Legionella TEST (12 testů v soupravě)
852-010 Binax NOW[®] Legionella Kontrolní tampony

VÝROBCE

Inverness medical
profesional diagnostics

Binax, Inc., 10 Southgate Road, Scarborough, Maine 04047 USA
TEL: USA: 800-257-9525 Mimo USA: 1-609-627-8000
FAX: (207) 730-5710
INTERNET: www.binax.com