



## VIRAPID® LEGIONELLA CULTURE

Producto para diagnóstico *in vitro*

**VRO02:** Test inmunocromatográfico para la detección cualitativa de *Legionella* género, *Legionella pneumophila* serogrupo 1 y *Legionella pneumophila* serogrupos 1-15 en muestras provenientes de cultivos bacterianos obtenidos a partir de muestras respiratorias humanas o muestras ambientales. 25 tests.

### INTRODUCCIÓN:

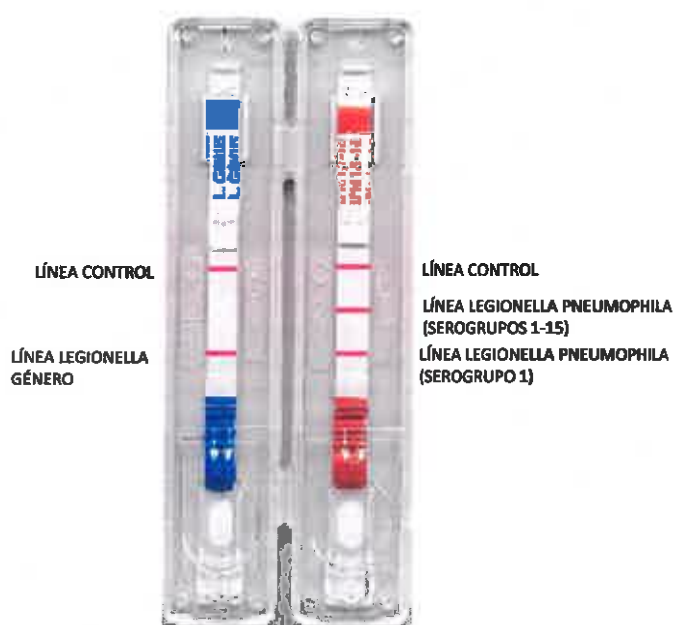
El VIRAPID® LEGIONELLA CULTURE es un inmunoensayo para la detección cualitativa de *Legionella* género, especie y serogrupo. Este test es para uso profesional y ayuda en la determinación del tipo de *Legionella* encontrada en un cultivo bacteriano. Estas muestras pueden tener 2 orígenes: clínico o ambiental. En el primer caso se trata de cultivos bacterianos obtenidos a partir de muestras respiratorias de enfermos de neumonía atípica. En el segundo caso, se trata en la mayoría de los casos de muestras que provienen de las torres de refrigeración para acondicionadores de aire o de otros reservorios donde el agua pueda quedar estancada durante largos periodos de tiempo, tales como condensadores para evaporación, piscinas, bañeras, etc.

El género *Legionella* tiene cerca de 50 especies diferentes y unos 80 serogrupos (serotipos) distintos y de todos ellos destaca la *L. pneumophila* y particularmente los serogrupos 1, 4 y 6 que son los responsables de la mayoría de los casos de legionelosis. De estos, la *L. pneumophila* serogrupo 1, es la que aparece como patógeno principal, produciendo el 80% de los casos de legionelosis y es la que se aísla con mayor frecuencia, tanto en pacientes como en muestras de agua de instalaciones de edificios. Causa neumonía atípica, a menudo con manifestaciones sistémicas. Es responsable del 10% de los casos de neumonía, tanto de las adquiridas en la comunidad como de las hospitalarias. Durante el curso de la infección, se desencadena una respuesta inmune frente al antígeno de grupo de *L. pneumophila*. Sin embargo, la presencia de otras especies de *Legionella* en el agua es considerada también como un riesgo potencial. Especies como *Legionella micdadei*, *Legionella dumoffi*, *Legionella bozemanii*, *Legionella feeli* y *Legionella longbeachae* aparecen a menudo en instalaciones de suministro de agua y han sido causantes de algunos brotes declarados. Por todo esto se hace necesario un test capaz de clasificar las muestras de *Legionella* provenientes de un cultivo, y de esta manera determinar la patogenicidad del mismo.

Una manera de determinar la especie y serogrupo de *Legionella*, ha sido utilizando monoclonales (Mab) específicos de distintas partes de la pared de la bacteria. Para el género se han empleado monoclonales anti PAL (peptidoglycan-associated-lipoprotein) común en todas las especies de *Legionella*; en la especie un monoclonal frente a un epítipo común presente en todos los serogrupos de *L. pneumophila* (serogrupos 1-15), el MOMP (Major Outer Membrane Protein), mientras que para el serogrupo 1 de la *L. pneumophila* se utilizan monoclonales frente al LPS (Lipopolisacárido).

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Las bacterias son resuspendidas en un medio para extraer los componentes de su pared. Cuando se añade la muestra extraída en cada uno de los pocillos del test, el oro coloidal se solubiliza y se produce la primera reacción inmunológica entre los componentes bacterianos y el correspondiente Mab unido al oro coloidal. Estos complejos migran por la membrana hasta las correspondientes líneas de reacción (líneas test), apareciendo una línea roja cuando el Mab complementario unido a la membrana, se une a estos complejos. En cada una de las tiras se incluye una línea control, cuya misión es la de validar el ensayo, que en todos los casos debe aparecer, incluso cuando la muestra es negativa.



### CARACTERÍSTICAS:

Recomendamos leer atentamente el apartado de "Recomendaciones y precauciones". VIRAPID® LEGIONELLA CULTURE identifica los principales grupos de *Legionella* con importancia clínica y ambiental en un único ensayo. El test se realiza en minutos con la ayuda de materiales y equipamiento comúnmente usado en laboratorios de análisis y puede ser leído visualmente.

El uso de monoclonales frente a antígenos comunes asegura la reactividad frente a las diversas especies y serogrupos no testados previamente.

### CONTENIDO DEL KIT:

- 1 VIRCELL LEGIONELLA CULTURE CASSETTE: 25 casetes para la detección específica de *Legionella* género, *L. pneumophila* serogrupo 1 y *L. pneumophila* serogrupos 1-15.
- 2 VIRCELL LEGIONELLA CULTURE DISRUPTER: 1 gotero con una solución tamponada. Contiene azida sódica.
- 3 VIRCELL LEGIONELLA POSITIVE CONTROL: 1 suspensión desecada de *L. pneumophila* serogrupo 1 inactivada.
- 4 VIRCELL LEGIONELLA NEGATIVE CONTROL: 1 suspensión desecada de *Pseudomonas aeruginosa* inactivada.

Conservar a 2-30°C y comprobar la fecha de caducidad.

**Material necesario no contenido en el kit:**

- Termobloque (opcional)
- Micropipetas automáticas y sus puntas correspondientes
- Reloj avisador
- Vortex

**CONSERVACIÓN:**

Conservar a temperatura ambiente o refrigerado, 2 a 30°C. No congelar

No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La caducidad indicada será válida siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 30°C.

**ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:**

Componente	Estabilidad
VIRCELL CASSETTE	Una vez abierto usar en la siguiente hora
VIRCELL DISRUPTER	Almacenar a 2-30°C y usar hasta su fecha de caducidad
VIRCELL POSITIVE CONTROL y VIRCELL NEGATIVE CONTROL reconstituido	Almacenar a 2-8°C durante 2 meses

**ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:**

El kit es estable hasta su fecha de caducidad a 2-30°C. Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

**RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:**

1. Este producto es sólo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
2. Usar sólo componentes del kit. No intercambiar VIRCELL CASSETTE, VIRCELL DISRUPTER, VIRCELL POSITIVE CONTROL y VIRCELL NEGATIVE CONTROL entre lotes y equipos.
3. Las muestras deben ser tratadas como si fuesen infecciosas, utilizando procedimientos de seguridad del laboratorio.
4. Usar guantes protectores desechables, batas de laboratorio, y protección ocular cuando se manipulen las muestras. Lavarse las manos adecuadamente tras la manipulación de las muestras.
5. No use el kit tras su fecha de caducidad.
6. Todo el material no usado debe ser desechado de acuerdo a la regulación aplicable.
7. Los componentes de este equipo podrán contener sustancias de origen animal y/o humano. A pesar de no ser infeccioso, este material debería ser manipulado como potencialmente infeccioso. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.
8. El VIRCELL DISRUPTER contiene azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías metálicas y dar lugar a componentes explosivos. Utilizar una gran cantidad de agua a la hora de tirar la solución. Observe la regulación local en materia de residuos químicos.
9. Si el test o elementos del mismo se almacenan en el refrigerador, han de estar a temperatura ambiente antes de ser utilizados.

10. Los casetes son estables en los sobres sin abrir hasta la fecha que marca en la etiqueta. No abrir el sobre hasta el momento de usarlos.

11. Se pueden hacer varios test al mismo tiempo.

12. Para un correcto funcionamiento del test, es necesario resuspender adecuadamente una cantidad suficiente de cultivo bacteriano en el medio suministrado.

**PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:**

Por cada muestra, añadir 8 gotas de VIRCELL DISRUPTER [2] (~200 µl) en tubos tipo eppendorf de 0.5 a 1.5 ml.

Reconstituir el VIRCELL POSITIVE CONTROL y el VIRCELL NEGATIVE CONTROL cuando se vayan a usar, con 8 gotas de VIRCELL DISRUPTER [2]. Agitar en un vortex hasta una buena homogeneización.

**TOMA DE MUESTRA:**

Seleccionar dos colonias típicas (1-3 mm) de la placa de cultivo y resuspender en 8 gotas de VIRCELL DISRUPTER [2]. Agitar en un vortex hasta su completa homogeneización.

**PROCEDIMIENTO DEL TEST:**

1. Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando extraer el casete del envase.
2. Abrir el sobre y colocar el casete [1] en una superficie plana.
3. Homogeneizar la muestra usando un vortex.
4. Con una micropipeta automática, dosificar en cada pocillo 90 µl de muestra, siempre empezando por el test L.GENUS.
5. Leer los resultados a los 30 minutos.

**⚠ Las medidas por encima de los 30 minutos podrían ser imprecisas.**

**CONTROL DE CALIDAD INTERNO:**

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles. Se incluyen controles positivos y negativos para confirmar el buen funcionamiento del kit en su laboratorio. Para el uso de éstos, tras su reconstitución (ver "Preparación de los reactivos"), se ensayan según lo descrito en "Procedimiento del test".

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:**

Para llevar a cabo la lectura de los resultados y determinar la positividad de la muestra, se usa una tarjeta de intensidades, incluida en el kit. Dispone de cuatro niveles colorimétricos de respuesta, desde 0.5 hasta 3. Si la intensidad de la línea test es menor de 0.5, la muestra se considera negativa, y positiva cuando la banda es igual o más intensa que dicho valor.

Si en la muestra hay *Legionella* específica de cada conjugado, esto dará lugar a la aparición de líneas coloreadas en su zona correspondiente. Un cultivo será positivo cuando alguna o varias de las líneas test aparezcan, además de la línea control, cuya misión es la de informar sobre la validez del ensayo.

La interpretación de los resultados positivos se realiza a partir de las siguientes fotografías y se resumen en una tabla a continuación:



LEGIONELLA GÉNERO POSITIVO    L. PNEUMOPHILA SEROGRUPO 1 POSITIVO    L. PNEUMOPHILA SEROGRUPOS 2-15 POSITIVO    NEGATIVO

GÉNERO	SEROGRUPO 1	ESPECIE (SEROGRUPOS 1-15)	CL	INTERPRETACIÓN
+	-	-	+	Legionella género
+	+	+	+	Legionella pneumophila serogrupo 1
+	-	+	+	Especie Legionella pneumophila (serogrupos 2-15)
-	-	-	+	No Legionella
(*)	(*)	(*)	-	RESULTADO NO VÁLIDO
-	+	+	+	RESULTADO NO VÁLIDO
-	-	+	+	RESULTADO NO VÁLIDO
-	+	-	+	RESULTADO NO VÁLIDO
+	+	-	+	RESULTADO NO VÁLIDO

CL: línea control  
 (\*): cualquiera que sea el resultado

Los resultados inválidos deberían repetirse con una nueva suspensión bacteriana. Si los resultados son inválidos tras la repetición del test, un nuevo test debería ser realizado tras el reaislamiento del cultivo; de lo contrario, debería usarse un test diferente para caracterizar el cultivo.

**LIMITACIONES DEL MÉTODO:**

- Este método está diseñado para ser utilizado con cultivos bacterianos obtenidos a partir de muestras respiratorias humanas o de muestras ambientales. No ha sido verificado con otros tipos de muestras.
- El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, y tiempos y temperaturas de incubación.
- El test no ha sido diseñado ni evaluado para identificar bacterias completas o componentes de bacterias directamente de muestras biológicas como orina, secreciones respiratorias o agua.
- Como cualquier test diagnóstico, los resultados deben ser valorados considerando todos los datos clínicos y de laboratorio. Los resultados del kit deben ser usados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos.
- Los resultados del test son cualitativos.

6. La fiabilidad de los resultados dependerá de una adecuada recogida de las muestras, transporte, almacenamiento y procedimientos de procesamiento y cultivo.

7. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que una cepa de Legionella esté presente en la muestras. Un resultado negativo podría corresponder a la presencia del microorganismo en niveles por debajo del límite de detección del ensayo.

8. A pesar de que el test ha sido evaluado con un gran número de aislados de Legionella, no se puede descartar que algunas cepas de Legionella presenten diferencias antigénicas, que las hagan no reactivas al test.

9. Un test positivo no excluye la posibilidad de que otros patógenos estén presentes.

**PRESTACIONES:**

• **SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:**

Tres grupos de muestras han sido analizadas para evaluar las prestaciones del test: Grupo I) Cepas bacterianas de colecciones de referencia (NCTC, DSMZ, ATCC) y 13 legionelas no clínicas; Grupo II) 141 colonias aisladas de 64 muestras de agua, recibidas de un laboratorio acreditado de análisis de aguas para test de legionelas; y Grupo III) un grupo de aislados clínicos comprendido por 8 Pseudomonas sp, 1 Acinetobacter sp, 1 Staphylococcus aureus, 1 estreptococo viridans, 1 Haemophilus sp y 2 Streptococcus sp, procedentes de un hospital español.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Líneas test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Legionella pneumophila serogrupo 1	97%	>99%
Legionella pneumophila serogrupos 1-15	100%	
Legionella género	100%	

• **SENSIBILIDAD ANALÍTICA:**

El kit dio resultado positivo con una suspensión de L. pneumophila serogrupo 1 (ATCC 33152) McFarland 0.25, 1 suspensión de L. pneumophila serogrupo 5 (ATCC 33216) McFarland 0.5 o una suspensión de Legionella longbeachae (NC11530-02) McFarland 0.25.

• **PRECISIÓN INTRAENSAYO:**

4 muestras (una positiva cercana al límite de detección para cada línea test y una negativa) fueron ensayadas 5 veces en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas.

En todos los ensayos se observaron resultados equivalentes.

• **PRECISIÓN INTERENSAYO:**

4 muestras (una positiva cercana al límite de detección para cada línea test y una negativa) fueron ensayadas individualmente durante 3 días consecutivos por 2 operadores diferentes.












En todos los ensayos se observaron resultados equivalentes.

• **REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:**

Se ensayaron los siguientes aislados clínicos bacterianos: Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas sp (8 aislados),

*Salmonella* sp, *Proteus mirabilis*, *Xantomonas* sp, *Aeromonas* sp, *Enterobacter aerogenes* *Staphylococcus aureus* (2 aislados), *Escherichia coli*, *Serratia* sp, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp, *Citrobacter* sp, *Acinetobacter* sp, *Haemophilus* sp, *Streptococcus* sp (2 aislados) y estreptococo viridians, todas las muestras procedentes de un Hospital español. No se obtuvo ningún resultado falso positivo.

#### SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-y°C
	Contiene suficiente para <X> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	Resultado negativo
	Resultado positivo: intensidad baja
	Resultado positivo: intensidad alta
	Carta de interpretación de VIRAPID®

#### BIBLIOGRAFÍA:

1. Barry, S. Fields, Robert F. Benson, and Richard E. Besser. 2002 *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin Microbiol Reviews*, July 15(3):506-526.
2. Frederick S. Nolte and Christopher A. Conlin. 1986 Major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* carries a species-specific epitope, *J Clin Microbiol*, Mar, 23(3):643-646.
3. Jamie Bartram, Yves Chartier, John V. Lee, Kathy Pond and Susanne Surman-Lee. World Health Organization 2007 *Legionella* and the prevention of Legionellosis.
4. Jean R. Joly, Roger M. McKinney, John O. Tobin, William F. Bibb, Ian D. Watkins, and Danielle Ramsay. 1986 Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, April, 23(4):768-771.
5. Min Ja Kim, Jang Wook Sohn, Dae Won Park, Seung Chul Park and Byung Chul chun. 2003 Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' Disease. *J Clin Microbiol*, July 41(7):2974-2979.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:



REVISADO: 05/2014