
CERTEST

S. pneumoniae+
Legionella

ONE STEP

S. pneumoniae+*Legionella*

COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



For information purposes only

ENGLISH**INTENDED USE**

CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* serogroup 1 in human urine samples.

CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* combo card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of *pneumoniae* and/or legionellosis in infected humans.

INTRODUCTION

Gram positive bacteria, *Streptococcus pneumoniae* is one of the most important pathogen that affects mainly children and elderly and can cause life-threatening diseases. *Streptococcus pneumoniae* infection leads to many clinical manifestations including meningitis, septicaemia, bacteraemia, pneumonia, acute otitis media, and sinusitis. It has caused great morbidity and mortality worldwide, especially in children. Pneumococcal infection annually has caused approximately 14.5 million cases of invasive pneumococcal disease (IPD) and 0.7–1 million deaths in children under five years old, mostly in developing and underdeveloped countries. Based on differences in the polysaccharide capsules of the pneumococcal cell wall, *Streptococcus pneumoniae* is classified into over 90 serotypes, which present different antigenic properties and induce different inflammatory responses.

Legionnaires' Disease, named after the outbreak in 1976 at the American Legion convention in Philadelphia, is caused by *Legionella pneumophila* and is characterized as an acute febrile respiratory illness ranging in severity from mild illness to fatal pneumonia. The disease occurs in both epidemic and endemic forms and sporadic cases are not easily differentiated from other respiratory infections by clinical symptoms. An estimated 25,000 to 100,000 cases of *Legionella* infection occur in the United States annually. The resulting mortality rate, ranging from 25% to 40%, can be lowered if the disease is diagnosed rapidly and appropriate antimicrobial therapy is instituted early. Known risk factors include immunosuppression, cigarette smoking, alcohol consumption and concomitant pulmonary disease. The young and the elderly are particularly susceptible. *Legionella pneumophila* is responsible for 80-90% of reported cases of Legionella infection with serogroup 1 accounting for greater than 70% of all legionellosis. Current methods for the laboratory detection of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* require a respiratory specimen (e.g. expectorated sputum, bronchial washing, transtracheal aspirate, lung biopsy) or paired sera (acute and convalescent) for an accurate diagnosis.

The CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* allow for early diagnosis of *S. pneumoniae* and/or *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection through detection of some specific soluble antigens present in the urine of patients with *S. pneumoniae* and/or *L. pneumophila*. The test is rapid, giving a result at 15 minutes, and utilizes a urine specimen which is convenient for collection, transport, and subsequent detection of early, as well as later, stages of disease.

TEST PRINCIPLE

CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) and *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) in urine samples.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *S. pneumoniae* and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (monoclonal antibodies anti-*S. pneumoniae*) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to blue polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with polyclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *L. pneumophila* and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (polyclonal antibodies anti-*L. pneumophila* conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to blue polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

If the sample is *Streptococcus pneumoniae* positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*S. pneumoniae* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is *L. pneumophila* positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugated complex (anti-*L. pneumophila* polyclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in strip B, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-*S. pneumoniae* antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-*L. pneumophila* antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no *S. pneumoniae* and *L. pneumophila* presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-*S. pneumoniae*



CERTEST *S. pneumoniae*+*Legionella*

One Step test to detect *S. pneumoniae* and *Legionella* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *S. pneumoniae* y *Legionella* en formato cassette

and anti-*L. pneumophila* antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red -coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control blue-conjugate complex and both control lines will always appear. The presence of these blue lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provided in the kit are approved for use in the CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Urine specimens should be collected in standard containers. The samples can be stored at room temperature (15-30°C) if assayed within 24 hours of collection. Alternatively, specimens may be stored at 2-8°C for up to 14 days or at -10°C to -20°C for longer periods before testing. When necessary, urine specimens should be shipped in leak-proof containers at 2-8°C or frozen. Allow all specimens to equilibrate to room temperature before testing.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* combo card tests
- Plastic pipettes
- Testing tubes
- Reagent (sample and controls diluent)
- Positive Control Swab: Inactivated *S. pneumoniae* swab + testing tube+ pipette
- Positive Control Swab: Inactivated *L. pneumophila* swab + testing tube + pipette
- Negative Control Swab: negative swab + testing tube + pipette
- Instructions for use

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

Allow tests, urine samples, diluent and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay

Procedure A: Patient samples

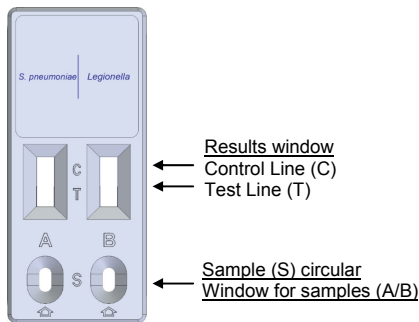
1. Using a separate testing tube or vial for each sample. Add 6 drops of urine sample (1).
2. Add 2 drop of Reagent into the testing tube or vial and mix (2). Homogenize the sample.
3. Remove CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* card test from its sealed bag just before using it.



CERTEST *S. pneumoniae*+*Legionella*

One Step test to detect *S. pneumoniae* and *Legionella* in combo card format/
 Prueba combo de un solo paso para detección de *S. pneumoniae* y *Legionella* en formato cassette

- Use a separate pipette and device for each sample or control. Dispense 3 drops from the testing tube in the circular window marked with the letter A (3) and 3 drops, using the same testing tube, in the circular window marked with the letter B (4).
- Read the results at 15 minutes.** Do not read the test result later than 15 minutes.



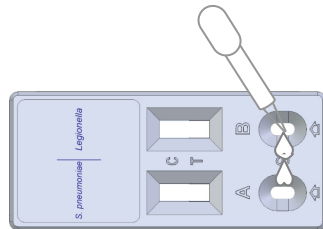
(1)
Add 6 drops of Urine Sample



(2)
Add 2 drops of Reagent and mix

S. pneumoniae Strip A-procedure

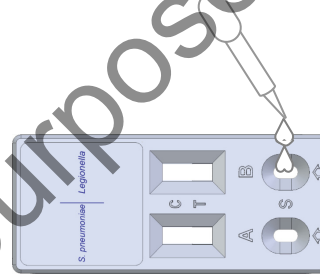
Add 3 drops in A-circular window



(3)

Legionella Strip B-procedure

Add 3 drops in B-circular window



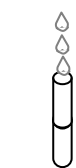
(4)

Procedure B: Positive Control Swabs.

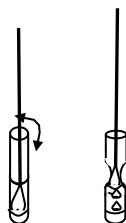
- Hold Reagent vertically. Add slowly 13 free falling drops of Reagent into the testing tube (1a).
- Immediately remove *S. pneumoniae* Positive Control swab from the pouch and put the swab into the testing tube with reagents, mix 1 minute and extract as much liquid possible from the swab, squeezing the sides of the tube as the swab is withdrawn. Discard the swab (2a).
- Remove the CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* device from its sealed bag just before using.
- Use a separate pipette and device for each sample or control. Dispense 3 drops from the testing tube, into the circular window marked with the letter A (3a).
- Read the result at 15 minutes.** Do not read the test result later than 15 minutes.

Repeat the procedure for Positive Control Swabs using CerTest *Legionella* Positive Control swab (1b, 2b), to dispense 3 drops from the testing tube, into the circular window marked with the letter B (3b).

Procedure B: Positive Control Swabs

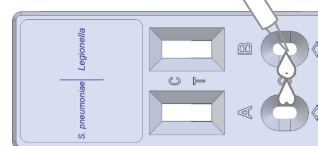


(1a) Add 13 drops of Reagent



(2a) Introduce the CerTest *S. pneumoniae* Positive Control swab and mix 1 minute. Extract the liquid

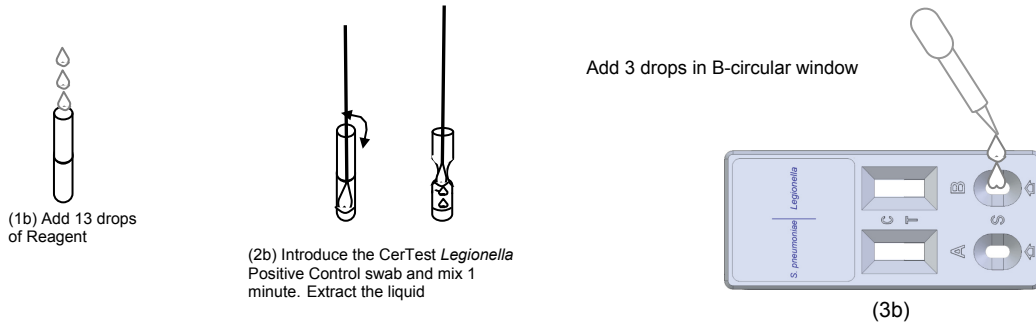
Add 3 drops in A-circular window



(3a)

CERTEST *S. pneumoniae*+*Legionella*

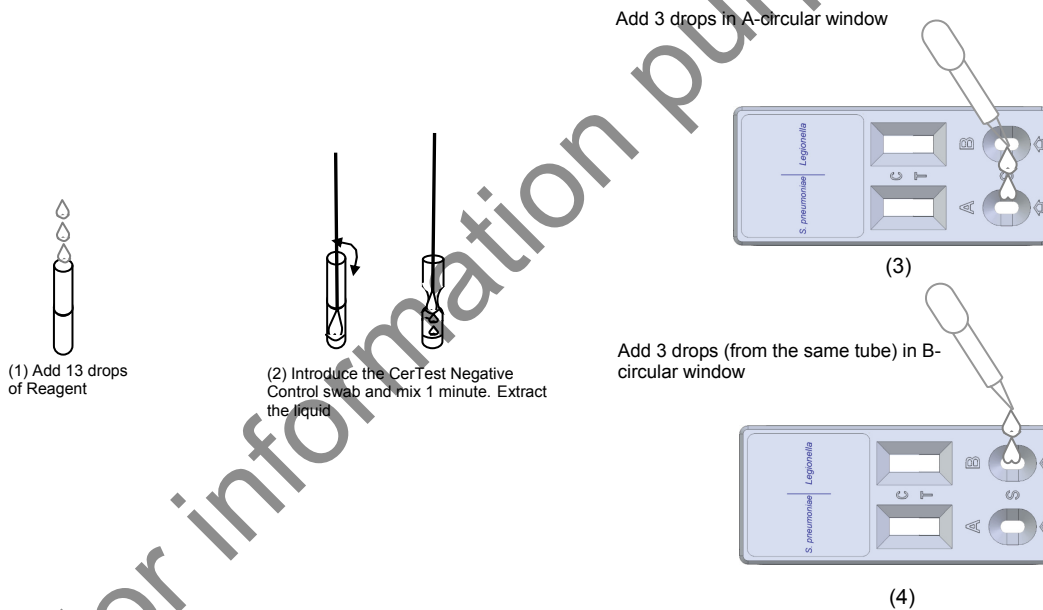
One Step test to detect *S. pneumoniae* and *Legionella* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *S. pneumoniae* y *Legionella* en formato cassette



Procedure C: Negative Control Swab.

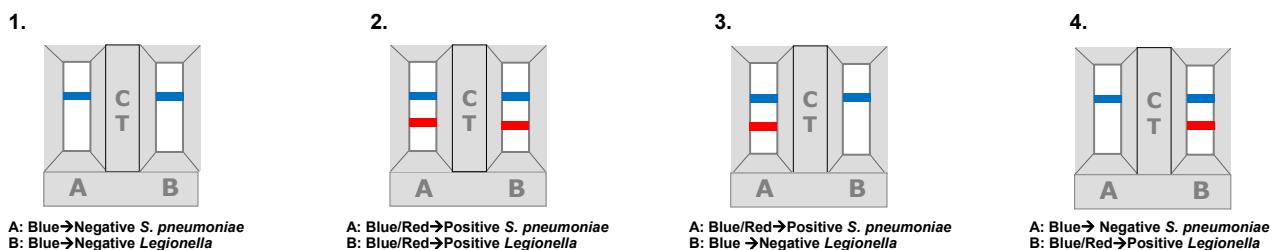
- Hold Reagent vertically. Add slowly 13 free falling drops of Reagent into the testing tube (1).
- Immediately remove Negative control swab from the pouch and put the swab into the testing tube with reagents, mix 1 minute and extract as much liquid possible from the swab, squeezing the sides of the tube as the swab is withdrawn. Discard the swab (2).
- Remove the CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* device from its sealed bag just before using.
- Use a separate pipette and device for each sample or control. Dispense 3 drops from the testing tube, into the circular window marked with the letter A (3) and other 3 drops from the same testing tube into the circular window marked with the letter B (4).
- 10. Read the result at 15 minutes.** Do not read the test result later than 15 minutes.

Procedure C: Negative Control Swab

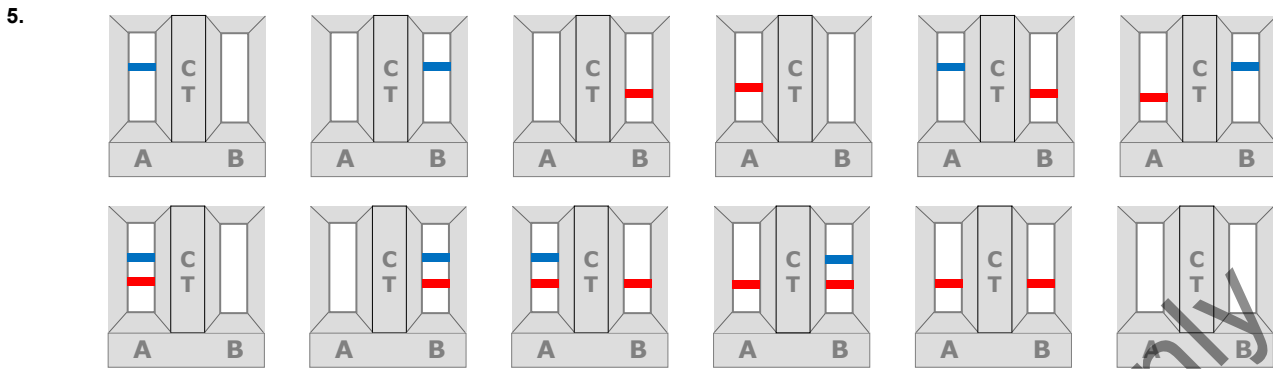


Positive and negative controls should be tested once for each new test kit opened and as otherwise required by your laboratory's standard quality control procedures.

INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)



INVALID RESULTS



	A (<i>S. pneumoniae</i>)	B (<i>Legionella</i>)	Interpretation of the results
1.	-	-	There is no <i>S. pneumoniae</i> or <i>L. pneumophila</i> presence. No infection caused by <i>S. pneumoniae</i> or <i>L. pneumophila</i> serogroup 1. Negative control result.
2.	+	+	There is <i>S. pneumoniae</i> and <i>L. pneumophila</i> presence. Infection caused by <i>S. pneumoniae</i> and <i>L. pneumophila</i> serogroup 1. Positive controls result.
3.	+	-	There is <i>S. pneumoniae</i> presence. Infection caused by <i>S. pneumoniae</i> . <i>S. pneumoniae</i> Positive control result.
4.	-	+	There is <i>L. pneumophila</i> presence. Infection caused by <i>L. pneumophila</i> serogroup 1. <i>Legionella</i> Positive control result.
5.	Any other result	Any other result	Invalid result either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

INVALID: Total absence of any control coloured line (BLUE) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persist, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The blue lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

External Positive and Negative Controls are included in the kit (see procedure B and C). The use of positive and negative controls is recommended to assure functionality of reagents and proper performance of assay procedure.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* should be used only with human urine samples. The use of other samples (e. g. plasma, serum or other body fluids or environmental samples (water)) has not been established.
3. Positive results determine the presence of *S. pneumoniae* and/or *Legionella* serogroup 1 in urine samples; nevertheless, a positive result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.



CERTEST *S. pneumoniae*+*Legionella*

One Step test to detect *S. pneumoniae* and *Legionella* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *S. pneumoniae* y *Legionella* en formato cassette

4. A negative result is not meaningful because of it is possible the antigens concentration in the urine sample is lower than the detection limit values. If the symptoms or situation still persist, a *S. pneumoniae* and/or *L. pneumophila* serogroup 1 determination should be carried out from a culture or other methods.
5. Excretion of *S. pneumoniae* and *Legionella* antigen in urine may vary depending on the individual patient. For *legionella* antigen excretion may begin as early as 3 days after onset of symptoms and persist for up to 1 year afterwards. A positive CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* result can occur due to current or past infection and therefore is not definitive for infection without other supporting evidence.
6. It has been proven that although the test is compatible with boric acid, its presence increases the reactivity and can lead to false positives, so it is not recommended as a preservative.

EXPECTED VALUES

Streptococcus pneumoniae is the main cause of community acquired pneumonia, but also responsible cause of other diseases: meningitis, bloodstream infection, otitis. In United States of America, some analysis estimated that this pathogen was responsible of more than 4 million of illness episodes, 400000 hospitalization and 20000 deaths per year. The performance of the CerTest *Streptococcus pneumoniae* test has been evaluated by using positive and negative urine samples from European patients, as well as spiked urines.

More than 50 *Legionella* species have been characterized, and 25 species are known to cause human disease. Most human infections are caused by *Legionella pneumophila*, which is responsible for approximately 90% of the identified clinical cases, and the predominant serogroup is serogroup 1.

In recent years, hot springs have been recognized as a major source of outbreaks of legionellosis. Several outbreaks and a number of cases of *Legionella* infection that were associated with hot springs have been reported in Japan, Spain and France.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity (detection limit)

Detection limit value of CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* is: 0.25ng/mL of CWPS for strip A (*S. pneumoniae*) and 12.5ng/mL (pool of several serovars of *Legionella pneumophila*) for strip B (*Legionella*).

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation was performed, with urine samples, comparing the results obtained by the immunocromatographic test (CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*, CerTest) and other commercial rapid test (BinaxNOW® *Streptococcus pneumoniae* Antigen Card, Alere) for strip A. The results were as follows:

		IC test: BinaxNOW® <i>Streptococcus pneumoniae</i> Antigen Card		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>S. pneumoniae</i>)	+	33	1	34
	-	4	73	77
	Total	37	74	111

CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>S. pneumoniae</i>) vs Binax NOW® <i>Streptococcus pneumoniae</i> Antigen Card		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	89.20%	74.6 – 97.0%
Specificity	98.60%	92.7 – 100.0%
PPV	97.10%	84.7 – 99.9%
NPV	94.80%	87.2 – 98.6%





CERTEST *S. pneumoniae*+*Legionella*

One Step test to detect *S. pneumoniae* and *Legionella* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *S. pneumoniae* y *Legionella* en formato cassette

Another evaluation was performed, with urine samples, comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*, CerTest) and other commercial rapid test (Binax NOW® *Legionella* Urinary Antigen Card, Alere) for strip B. The results were as follows:

		IC test: Binax NOW® <i>Legionella</i> Urinary Antigen Card		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>Legionella</i>)	+	31	1	32
	-	0	117	117
		31	118	149

CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>Legionella</i>) vs Binax NOW® <i>Legionella</i> Urinary Antigen Card		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	100.00%	88.8 – 100.0%
Specificity	99.20%	95.4 – 100.0%
PPV	96.90%	83.8 - 99.9%
NPV	100.00%	96.9 – 100.0%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *S. pneumoniae* and *Legionella pneumophila* serogroup 1 using CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*; no cross reactivity against other pathogens occasionally present in urine:

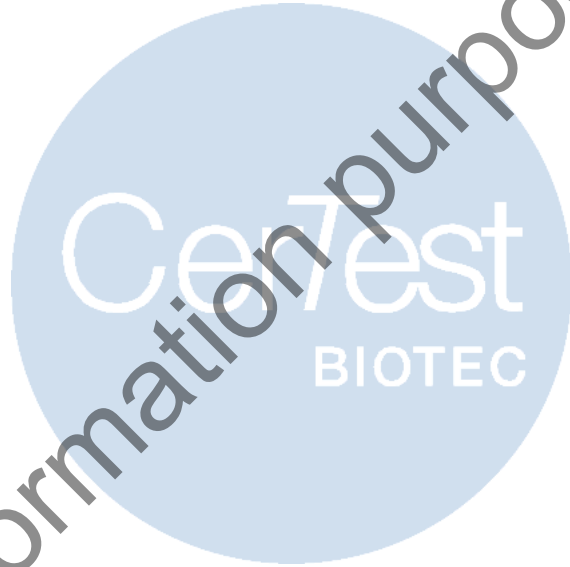
Legionella (Strip A) *Streptococcus pneumoniae* (Strip B)

Reproducibility Study

Evaluation studies were performed to determine reproducibility of the CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*, including inter-day, inter-laboratory, inter and intra lot, showing high reproducibility in all cases.



For information purposes only



USO PREVISTO

CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina humana.

CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de pneumonia (causado por *Streptococcus pneumoniae*) y/o legionelosis (causada por *Legionella pneumophila* serogrupo 1) en personas infectadas.

INTRODUCCIÓN

La bacteria Gram positiva *Streptococcus pneumoniae* es uno de los patógenos más importantes y que afecta principalmente a los niños y personas de edad avanzada. Puede causar enfermedades que amenazan la vida. La infección por *Streptococcus pneumoniae* lleva a muchas manifestaciones clínicas incluyendo meningitis, septicemia, bacteriemia, neumonía, otitis media aguda y sinusitis. Ha causado gran morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en los niños. La infección neumocócica ha causado aproximadamente 14.5 millones de casos de enfermedad neumocócica invasiva (ENI) y 0.7-1 millones de muertes en niños menores de cinco años por año, la mayoría en países en desarrollo y subdesarrollados. En base a las diferencias en las cápsulas de polisacáridos de la pared celular neumocócica, *Streptococcus pneumoniae* se clasifica en más de 90 serotipos diferentes que presentan propiedades antigénicas e inducen diferentes respuestas inflamatorias.

La legionelosis, que lleva ese nombre a raíz de un brote ocurrido en 1976 en una convención de la Legión Americana en Filadelfia, está causada por *Legionella pneumophila* y se caracteriza por una infección aguda febril de las vías respiratorias, cuya intensidad varía de una afección leve a una neumonía mortal. La enfermedad se presenta de forma epidémica y endémica y se dan casos esporádicos, cuyos síntomas clínicos no se diferencian fácilmente de otras infecciones respiratorias. Se estima que cada año se presentan de 25.000 a 100.000 casos de legionelosis en Estados Unidos. Un diagnóstico rápido y la administración temprana de una terapia antimicrobiana apropiada pueden reducir la tasa de mortalidad, que oscila entre el 25% y el 40%. Los factores de riesgo conocidos son la inmunosupresión, el tabaquismo, el consumo de alcohol y afecciones pulmonares concomitantes. Los jóvenes y ancianos son particularmente susceptibles.

Legionella pneumophila es el agente responsable del 80-90% de los casos mencionados de infección por el serogrupo 1 de *Legionella*, lo que representa más del 70% de todos los casos de legionelosis. Los métodos de laboratorio actuales para la detección de la neumonía causada por *Legionella pneumophila* requieren una muestra respiratoria (por ejemplo: esputo, lavado bronquial, aspirado trans-traqueal, biopsia pulmonar) o sueros pareados (agudo y convaleciente).

El test CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* permite el diagnóstico precoz de la infección por *Streptococcus pneumoniae* y/o por serogrupo 1 de *Legionella pneumophila* a través de la detección de unos antígenos solubles específicos presentes en la orina de pacientes con infección por *Streptococcus pneumoniae* y/o *L. pneumophila*. La prueba es rápida -dando un resultado en 15 minutos- y utiliza una muestra de orina -conveniente para la recogida, el transporte, y la posterior detección de principios, tanto en fase temprana como en otras etapas de la enfermedad.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección cualitativa de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) y *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) en muestras de orina.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales frente a *S. pneumoniae* en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales frente a *S. pneumoniae*) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno azul, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos policlonales frente a *L. pneumophila* en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos policlonales frente a *L. pneumophila*) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno azul, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es *S. pneumoniae* positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*S. pneumoniae*-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es *L. pneumophila* positiva, los antígenos de la muestra diluida de orina reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos policlonales anti-*L. pneumophila*-microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la

membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-*S. pneumoniae* presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-*L. pneumophila* presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de *S. pneumoniae* ni de *L. pneumophila* o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-*S. pneumoniae* y anti-*L. pneumophila* presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en ambas tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control azules siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Tome las muestras de orina en envases normales para este tipo de muestras. Dichas muestras se podrán almacenar a temperatura ambiente (15-30°) si la prueba se va a realizar dentro de las 24 horas de la toma de muestras. Como alternativa, se podrán almacenar las muestras a 2-8°C por un máximo de 14 días o entre -10°C y -20°C durante periodos más largos antes de realizar la prueba. Si fuera necesario trasladar las muestras de orina, téngalas en envases herméticos a 2-8°C o congeladas. Antes de realizar este test es preciso que todas las muestras alcancen la temperatura ambiente.

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* combo card tests
- Pipetas de plástico
- Tubos de ensayo
- Reactivo (diluyente de muestra y controles)
- Control Positivo: hisopo con *S. pneumoniae* inactivada + tubo ensayo+ pipeta
- Control Positivo: hisopo con *L. pneumophila* inactivada + tubo ensayo+ pipeta
- Control Negativo: hisopo negativo + tubo ensayo + pipeta
- Instrucciones de uso

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

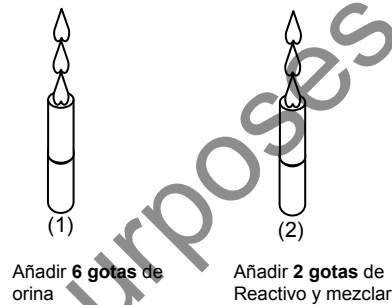
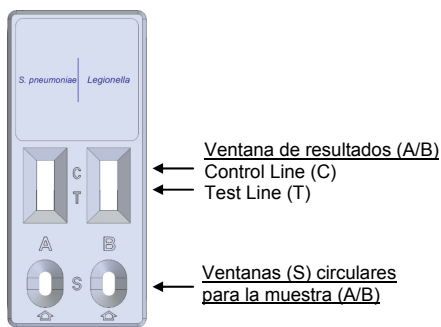
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

Previamente los tests, las muestras de orina, el reactivo y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C).
No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

Procedimiento A: Muestra de pacientes

1. Utilice un vial o tubo de ensayo diferente para cada muestra. Añada 6 gotas de muestra de orina (1).
2. Añada 2 gotas del Reactivo dentro del tubo de ensayo o vial y mezclar (2). Homogeneizar la muestra.
3. Sacar el test CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* de su envase antes de utilizarlo.
4. Usar una pipeta y un test diferente para cada muestra o control. Añadir 3 gotas a partir del vial en la ventana circular marcada con la letra A (3) y añadir 3 gotas, del mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (4).
5. **Leer el resultado a los 15 minutos.** No leer el resultado superados los 15 minutos.

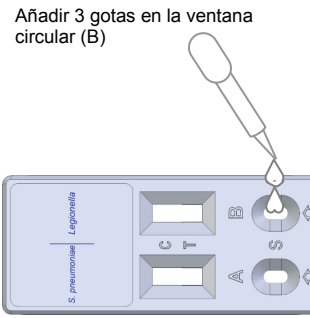


Procedimiento para la tira A de *S. pneumoniae*



(3)

Procedimiento para la tira B de *Legionella*



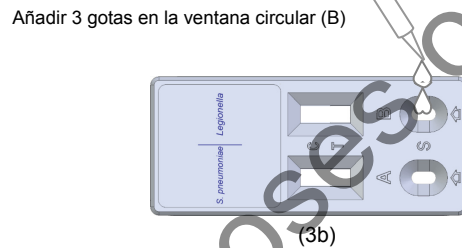
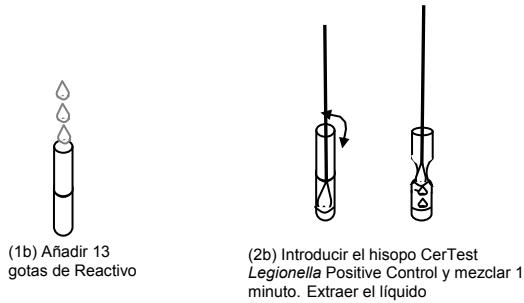
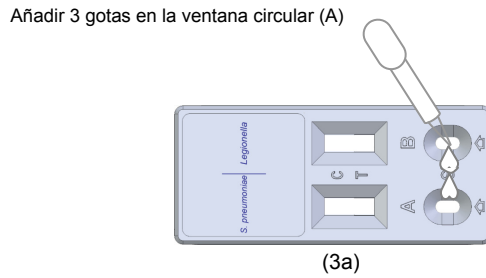
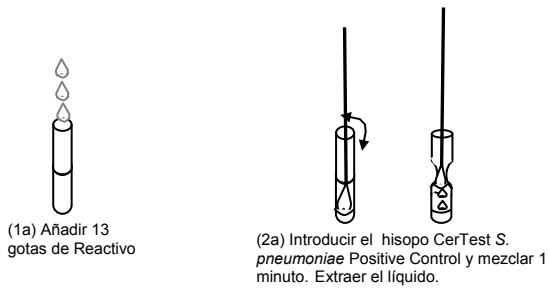
(4)

Procedimiento B: Hisopos Control Positivo

1. Colocar el bote de Reactivo verticalmente. Añadir lentamente 13 gotas del Reactivo en el tubo de ensayo (1a).
2. Sacar inmediatamente CerTest *S. pneumoniae* Positive control de su envase e introducir dentro del tubo de ensayo con el reactivo, mezclar durante 1 minuto y extraer la mayor cantidad posible de líquido del hisopo, presionando las paredes del tubo. Desechar el hisopo (2a).
3. Sacar el test CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* de su envase antes de utilizarlo.
4. Usar una pipeta y un test diferente para cada muestra o control. Añadir 3 gotas desde el tubo de ensayo, en el pocillo marcado con una A (3a).
5. **Leer el resultado a los 15 minutos.** No leer el resultado tras superar los 15 minutos.

Repita el procedimiento para controles positivos utilizando el hisopo CerTest *Legionella* Positive control swab (1b, 2b), se deben dispensar otras 3 gotas del mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (3b).

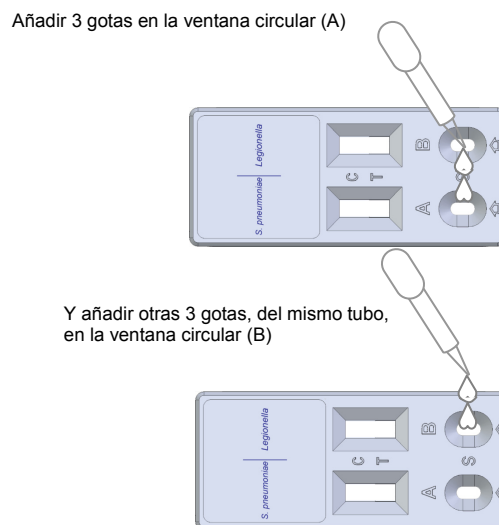
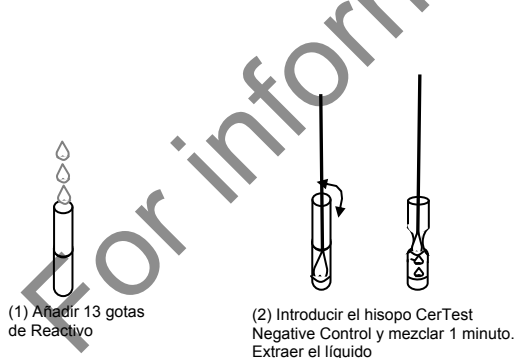
Procedimiento B: Hisopos Control Positivo



Procedimiento C: hisopo Control Negativo.

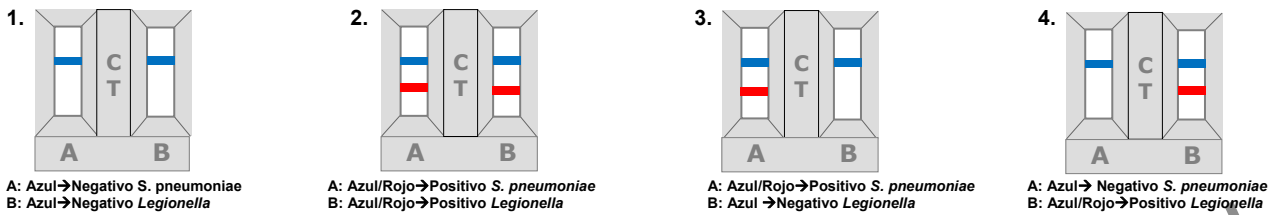
- Colocar el bote de Reactivo verticalmente. Añadir lentamente 13 gotas del Reactivo en el tubo de ensayo (1).
- Sacar inmediatamente CerTest Negative Control de su envase e introducir dentro del tubo de ensayo el reactivo, mezclar durante 1 minuto y extraer la mayor cantidad posible de líquido del hisopo, presionando las paredes del tubo. Desechar el hisopo (2).
- Sacar el test CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* de su envase antes de utilizarlo.
- Usar una pipeta y un test diferente para cada muestra o control. Añadir 3 gotas desde el tubo de ensayo, en el pocillo marcado con una A (3) y otras 3 gotas del mismo tubo en el pocillo marcado con la letra B (4).
- Leer el resultado a los 15 minutos.** No leer el resultado tras superar los 15 minutos.

Procedimiento C: Hisopo Control Negativo

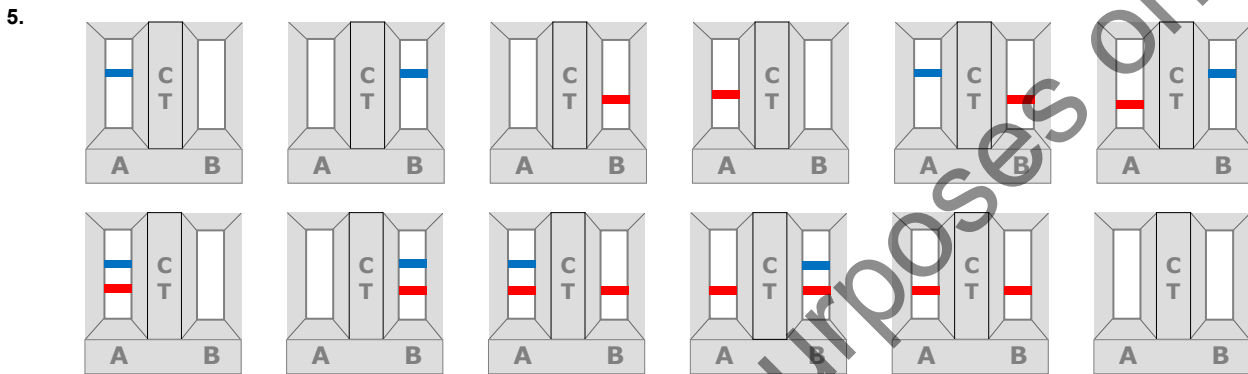


Los controles positivos y negativos deberían usarse cada vez que se utilice un nuevo kit o según indiquen los controles establecidos por su laboratorio para los procedimientos de control de calidad.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



RESULTADOS INVÁLIDOS



	A (<i>S. pneumoniae</i>)	B (<i>Legionella</i>)	Interpretación de los resultados
1.	- AZUL	- AZUL	No hay presencia de <i>S. pneumoniae</i> o <i>L. pneumophila</i> . No hay infección causada por <i>S. pneumoniae</i> o <i>L. pneumophila</i> serogrupo 1. Resultado del control negativo
2.	+ AZUL-ROJO	+ AZUL-ROJO	Hay presencia de <i>S. pneumoniae</i> y <i>L. pneumophila</i> . Infección causada por <i>S. pneumoniae</i> y <i>L. pneumophila</i> . Resultado controles positivos
3.	+ AZUL-ROJO	- AZUL	Hay presencia de <i>S. pneumoniae</i> . Infección causada por <i>S. pneumoniae</i> . Resultado <i>S. pneumoniae</i> Positive control
4.	- AZUL	+ AZUL-ROJO	Hay presencia de <i>L. pneumophila</i> . Infección causada por <i>L. pneumophila</i> . Resultado <i>L. pneumophila</i> Positive control
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido en A o en B: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (AZUL) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en las líneas de test (T) en la ventana de resultados variará dependiendo de la concentración de antígenos presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas azules que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

Controles externos Positivos y negativos se incluyen en el kit (ver procedimiento B). Se recomienda el uso de controles positivos y negativos para asegurar el correcto funcionamiento de los reactivos y la realización correcta de la muestra.

LIMITACIONES

1. Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
2. CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* debería utilizarse sólo con muestras de orina humanas. El uso de otras muestras (por ejemplo plasma, suero u otros fluidos del cuerpo o muestras ambientales (agua)) no ha sido evaluado.
3. Los resultados positivos determinan la presencia de *S. pneumoniae* y/o *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina; sin embargo, un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
4. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de orina sea inferior a los valores del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, la determinación de *S. pneumoniae* y/o *L. pneumophila* serogrupo 1 se debería realizar con un cultivo u otros métodos.
5. La excreción de antígenos de *S. pneumoniae* y *Legionella* en la orina puede variar para cada paciente. La excreción de antígeno de *Legionella* puede iniciarse a los 3 días del inicio de los síntomas y mantenerse hasta un año después. Es posible que se produzca un resultado positivo con CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*, debido a una infección presente o pasada y, por lo tanto, dicho resultado positivo no es definitivo para la infección a menos de existir otra evidencia.
6. Se ha comprobado que si bien el test es compatible con ácido bórico, su presencia incrementa la reactividad pudiendo conducir a falsos positivos, por lo que no se recomienda su uso como preservante.

VALORES ESPERADOS

El *Streptococcus pneumoniae* es la principal causa de neumonía adquirida en la comunidad, sino que también causa responsable de otras enfermedades: la meningitis, septicemia, otitis. En los Estados Unidos de América, algunos análisis estiman que este patógeno fue responsable de más de 4 millones de episodios de enfermedad, 400000 hospitalizaciones y 20000 muertes por año. El rendimiento de la prueba de CerTest *Streptococcus pneumoniae* ha sido evaluado mediante el uso de muestras de orina positivas y negativas de los pacientes europeos, así como muestras de orina preparadas.

Han sido caracterizadas más de 50 especies de *Legionella*, y se sabe que 25 especies causan enfermedad en humanos. La mayoría de estas infecciones humanas son causadas por *Legionella pneumophila*, la cual es identificada como responsable de aproximadamente el 90% de los casos clínicos, y el serogrupo predominante es el serogrupo 1.

En los últimos años, las primaveras calurosas se han reconocido como el principal origen de los brotes de legionelosis. Varios brotes y un gran número de casos de infección por *Legionella* que se asociaron con primaveras calurosas se registraron en Japón, España y Francia.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST**Sensibilidad analítica (límite de detección)**

El límite de detección de CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* es 0.25ng/mL de CWPS para la tira A (*S. pneumoniae*) y 12.5ng/mL (mezcla de varios serovares de *Legionella pneumophila*) para la Tira B (*Legionella*).

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de orina, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* CerTest) y otro test rápido comercializado (Binax NOW®*Streptococcus pneumoniae* Antigen Card, Alere) para la tira A. Los resultados se muestran a continuación:

CERTEST *S. pneumoniae*+*Legionella*

One Step test for detection of *S. pneumoniae* and *Legionella* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *S. pneumoniae*+*Legionella* en formato cassette

		IC test: Binax NOW® <i>Streptococcus pneumoniae</i> Antigen Card		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>S. pneumoniae</i>)	+	33	1	34
	-	4	73	77
Total		37	74	111

CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>S. pneumoniae</i>) vs Binax NOW® <i>Streptococcus pneumoniae</i> Antigen Card		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensibilidad	89.20%	74.6 – 97.0%
Especificidad	98.60%	92.7 – 100.0%
VPP	97.10%	84.7 - 99.9%
VPN	94.80%	87.2 – 98.6%

Se llevó a cabo otra evaluación, con muestras de orina, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* CerTest) y otro test rápido comercializado (Binax NOW® *Legionella* Urinary Antigen Card, Alere) para la tira B. Los resultados se muestran a continuación:

		IC test: Binax NOW® <i>Legionella</i> Urinary Antigen Card		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>Legionella</i>)	+	31	1	32
	-	0	117	117
		31	118	149

CerTest <i>S. pneumoniae</i> + <i>Legionella</i> (<i>Legionella</i>) vs Binax NOW® <i>Legionella</i> Urinary Antigen Card		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	100.00%	88.8 – 100.0%
Specificity	99.20%	95.4 – 100.0%
PPV	96.90%	83.8 - 99.9%
NPV	100.00%	96.9 – 100.0%

Los resultados mostraron que CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella* presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas del test CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*, no se detectó reacción cruzada con varios patógenos ocasionalmente están presentes en la orina:

Legionella (Tira A)

Streptococcus pneumoniae (Tira B)

Estudio reproducibilidad

Se realizó una evaluación para determinar la reproducibilidad del test CerTest *S. pneumoniae*+*Legionella*, incluyendo ensayos inter-día, inter-laboratorio, inter e intra lote que mostraron una alta reproducibilidad en todos los casos.

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

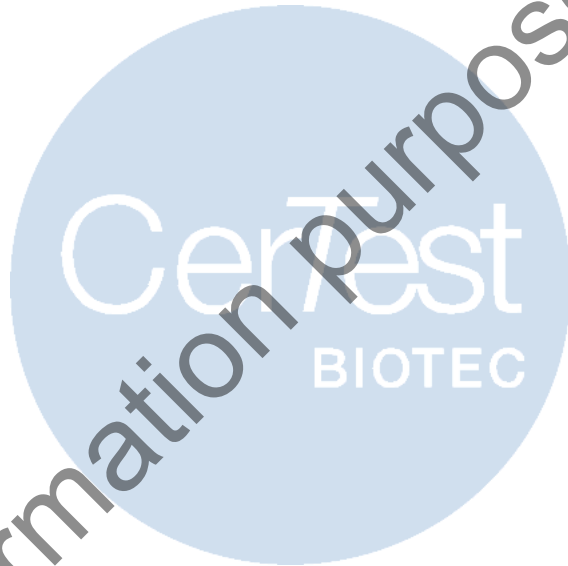
1. Montagnani F, Fanetti A, Stolzuoli L, Croci L, Arena F, Zanchi A, Cellesi C. J. "Pneumococcal disease in a paediatric population in a hospital of central Italy: a clinical and microbiological case series from 1992 to 2006", *Infect.* 2008 Mar;56 (3):179-84. doi: 10.1016/j.jinf.2007.12.002. Epub 2008 Jan 25.
2. Liu Y, Wang H, Chen M, Sun Z, Zhao R, Zhang L, Wang H, Zhang H, Wang L, Chu Y, Liu Y, Ni Y. "Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in China younger than 5 years". *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Jul;61(3):256-63. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.004. Epub 2008 Mar 20.
3. VPD Surveillance Manual, 5th Edition, 2012, 11 Pneumococcal Disease: Chapter 11-1.
4. ROIG, J. et. al. Comparative study of *Legionella pneumophila* and other nosocomial-acquired pneumoniae. *Chest.* 1991;99:344-50.
5. BERDAL, B.P., et al. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *J. Clin. Microbiol.* 1979;9:575-578.
6. WHITE A., et al. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease. *Trans Am Clin. Climatol. Assoc.* 1982;93:50-62.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	Keep dry Almacenar en lugar seco	Use by Fecha de caducidad	Manufacturer Fabricante	LOT	Batch code Número de lote	
i	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	Temperature limitation Limitación de temperatura	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	REF	Catalogue number Número de referencia
Control I	Positive Control. Control Positivo	Control II	Negative Control. Control Negativo				

For information purposes only

For information purposes only



CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

