

# NADAL<sup>®</sup> S. pneumoniae Test (test cassette)

REF 572004N-10



<b>DE</b>	Gebrauchsanweisung	2	<b>PL</b>	Sposób użycia	17
<b>EN</b>	Instructions for use	5	<b>PT</b>	Instruções de Utilização	20
<b>FR</b>	Instructions d'utilisation	8		Symbols	23
<b>ES</b>	Instrucciones de uso	11		Our Teams	24
<b>IT</b>	Istruzioni per l'uso	14			



### 1. Verwendungszweck oder Anwendungsbereich

Der NADAL® S. pneumoniae Test ist ein qualitativer Schnelltest, der für den Nachweis des *Streptococcus pneumoniae*-Antigens im Urin ohne Verdünnung und als Hilfsmittel bei der Diagnose von Pneumonie, Meningitis und Otitis media bestimmt.

### 2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) ist ein grampositives Bakterium (1), das erstmals im Jahr 1881 aus dem Speichel eines Patienten mit Tollwut von Pasteur isoliert wurde. 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 lanzettförmige anaerobe Organismen, die durch direkten 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 (2). *S. pneumoniae* besiedelt das Gewebe der oberen Atemwege und verursacht eine schwere Lungenentzündung und milde/akute Ohrenschmerzen/Otitis (3). Pneumokokken verursachen 13% bis 19% aller Fälle bakterieller Meningitis in den Vereinigten Staaten (4). 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 sein. 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 (5). 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.

### 3. Testprinzip

Der NADAL® S. pneumoniae Test ist ein qualitativer Schnelltest zum Nachweis des *Streptococcus pneumoniae*-Antigens im Urin ohne Verdünnung. Diese Methode verwendet eine einzigartige Kombination aus monoklonalem Antikörper-Farbstoff-Konjugat und monoklonalen Festphase-Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope, um *Streptococcus pneumoniae* selektiv mit hoher Empfindlichkeit zu erkennen. Wenn die Probe aufgetragen wird, bindet das markierte Antikörper-Farbstoff-Konjugat an das S. pneumoniae-Antigen und bildet einen Antikörper-Antigen-Komplex. Dieser Komplex bindet dann an immobilisierte S. pneumoniae-Antikörper im Testlinienbereich (T) und bildet eine rosa-pink-farbige Linie. Bei Abwesenheit von S. pneumoniae in der Probe, wird im Testlinienbereich (T) keine Linie vorhanden sein. Das

Reaktionsgemisch wandert weiter die Membran entlang. Ungebundenes Konjugat bindet an Reagenzien im Kontrolllinienbereich (C) und bildet eine rosa-pink-farbige Linie, die anzeigt, dass die Testreagenzien einwandfrei funktionieren und die Vorgehensweise korrekt war.

### 4. Bestandteile der Testpackung

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

### 5. Zusätzlich benötigte Materialien

- Urinsammelbehälter

### 6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Die Bestandteile des Testkits können im verschlossenen Folienbeutel bei Raumtemperatur (4-30°C) gelagert werden. Frieren Sie das Testkit nicht ein. Der Test ist stabil bis zum auf dem Folienbeutel angegebenen Haltbarkeitsdatum.

### 7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Test ist nur für den professionellen *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch bestimmt.
- Lesen Sie die Gebrauchsanweisung vor der Testdurchführung gründlich durch.
- Den Test nicht mehr nach dem auf dem Folienbeutel angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Den 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 Probensorgung.
- Tragen Sie beim Umgang mit Proben Schutzkleidung wie Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille.
- Feuchtigkeit und hohe Temperaturen können die Testergebnisse beeinträchtigen.

### 8. Probennahme, -vorbereitung und -lagerung

Sammeln Sie die Urinprobe in einem sauberen Behälter ohne Reinigungsmittel. Wenn die Testung nicht sofort durchgeführt wird, sollten die Proben bis zu 24 Stunden kühl (2-8°C) aufbewahrt werden. In diesem Fall bringen Sie die Probe vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur. Wenn die Testung für mehr als 24 Stunden verschoben wird, sollten die Proben eingefroren werden. Eingefrorene Proben sollten vor der Testung vollständig aufgetaut, gründlich gemischt und auf Raumtemperatur gebracht werden. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Einfrieren.

Im Zweifelsfall: Es ist möglich, die Sensitivität und die Spezifität des NADAL® S. pneumoniae Tests durch folgende Behandlung von Urinproben zu erhöhen:

- Erhitzen Sie eine Urinprobe für 5 Minuten bei 100°C.
- Zentrifugieren Sie sie für 15 Minuten bei 1000 g.
- Konzentrieren Sie den Überstand mit AMICON® ultra 4 Zentrifugalfiltrerröhrchen bis eine 25-fache Konzentration erreicht ist.

Alle behandelten/konzentrierten Proben sollten nach dem gleichen Testverfahren wie für unbehandelte Proben getestet werden.

### 9. Testdurchführung

**Bringen Sie die Proben und Testkassetten vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur.**

1. Entnehmen Sie die Testkassette dem Folienbeutel.  
2. Kennzeichnen Sie die Testkassette mit dem Namen des Patienten oder mit einer Kontrollnummer.

3. Halten Sie die Pipette senkrecht, füllen Sie sie mit der Urinprobe und geben Sie 5 Tropfen (200 µL) in die Probenvertiefung (S) der Testkassette.



4. Lesen Sie das Testergebnis nach 10 Minuten ab. Bitte bestätigen Sie negative Testergebnisse nach genau 15 Minuten. Nach mehr als 15 Minuten sollte keine Testauswertung mehr stattfinden.



10 min

### 10. Testauswertung

#### Positiv:

Zusätzlich zur farbigen Linie im Kontrolllinienbereich (C) erscheint eine klar erkennbare Linie im Testlinienbereich (T).



#### Negativ:

Es erscheint eine farbige Linie im Kontrolllinienbereich (C). Es erscheint keine Linie im Testlinienbereich (T).



#### Invalid:

Wenn keine deutliche, farbige Linie im Kontrolllinienbereich erscheint, ist der Test ungültig. Es empfiehlt sich in diesem Fall, dass der Test erneut durchgeführt wird oder eine neue Urinprobe gesammelt und später getestet wird.



### 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® S. pneumoniae Test ist ein Screening-Test auf das Vorhandensein der *Streptococcus pneumonia* in Urinproben.
- Wie bei allen diagnostischen Verfahren, sollten die mit diesem Test erhaltenen Daten vom Arzt in Zusammenhang mit anderen klinischen Information einschließlich Zellkulturen evaluiert werden, wenn die Ergebnisse im Widerspruch zum klinischen Erscheinungsbild stehen.
- Der Test unterscheidet nicht zwischen besiedelten und infizierten Personen.

- Der NADAL® S. pneumoniae Test kann nicht verschiedene Pneumokokken-Infektionen, die potenziell durch *Streptococcus pneumoniae* verursacht wurden, unterscheiden.
- In seltenen Fällen können Urinproben mit einem hohen spezifischen Gewicht (SG> 1,030) falsch positive Ergebnisse mit dem NADAL® S. pneumoniae Test zeigen.

### 13. Leistungsmerkmale des Tests

#### Sensitivität und Spezifität

##### Diagnostische Sensitivität und Spezifität

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

Der NADAL® S. pneumoniae Test vs. der BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae Schnelltest:

		BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae Schnelltest (Referenzmethode)		
		+	-	Total
NADAL® S. pneumoniae Test	+	26	4	30
	-	7	21	28
Total		33	25	58

Wie aus der oben aufgeführten Tabelle zu entnehmen ist, beträgt die diagnostische Sensitivität des NADAL® S. pneumoniae Tests 79% (26/33) und seine Spezifität 84% (21/25) im Vergleich zur Referenzmethode. Die Gesamtübereinstimmung beträgt 81% (47/58) und ist trotz der Tatsache zufriedenstellend, dass die lange Lagerung von 42 Proben (33 positiven und 9 negativen) eine Zersetzung der *Streptococcus pneumoniae*-Antigene möglicherweise verursacht haben kann.

#### Analytische Sensitivität

Serienverdünnungen von *Streptococcus pneumoniae*-Antigen im Urin wurden in negativem Urin durchgeführt. Die Verdünnungen wurden dann sowohl mit dem NADAL® S. pneumoniae Test als auch mit dem BinaxNOW® Test getestet. Die in der folgenden Tabelle dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der NADAL® S. pneumoniae Test sensitiver als der BinaxNOW® Test ist: während der NADAL® S. pneumoniae Test den Nachweis des *Streptococcus pneumoniae* Antigens im Urin in einer Konzentration von 35 pg/mL ermöglicht, weist der BinaxNOW® Test das Antigen nur ab einer minimalen Konzentration von 50 pg/mL nach.

Streptococcus pneumoniae Antigen im Urin	Ergebnisse	
	NADAL® S. pneumoniae Test (nach 10 Minuten)	BinaxNOW® Test (nach 15 Minuten)
25 (pg/mL)	-	-
30 (pg/mL)	-	-
35 (pg/mL)	+W	-
40 (pg/mL)	+	-
45 (pg/mL)	+	-
50 (pg/mL)	+	+W
100 (pg/mL)	+	+
200 (pg/mL)	+	+

+W = schwach positiv (weak positive)

### Kreuzreaktivität

Verschiedene Bakterienstämme wurden unter der Verwendung des NADAL® S. pneumoniae Tests getestet, um zu bestimmen, ob sie nicht-spezifische Reaktionen (Kreuzreaktionen) verursachen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Gruppe	Ergebnis
<b>S. pneumoniae Kapseltypen (8)</b>	<b>Positiv</b>
<b>Strep A, B, C, D, E, F, G &amp; H</b>	<b>Negativ</b>
<b>S. aureus</b>	<b>Negativ</b>
<b>B. subtilis</b>	<b>Negativ</b>

### Intra-Assay-Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurde anhand von 10 Replikaten von 5 Proben mit verschiedenen *Streptococcus pneumoniae*-Konzentrationen ermittelt. Alle Serien haben konvergierende Ergebnisse in Übereinstimmung mit erwarteten Ergebnissen gezeigt.

Die Intra-Chargen-Reproduzierbarkeit des NADAL® S. pneumoniae Test beträgt 100%.

### 14. Referenzen

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
2. CDC. Updated recommendations for preventionof invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34) : 1102-1106, 2010.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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, 2018-06-26 OM/KB

### 1. Intended Use

The NADAL® S. pneumoniae Test is a qualitative rapid assay which is intended to be used for the detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine without any dilution and as an aid in the diagnosis of pneumonia, meningitis and otitis media.

### 2. Introduction and Clinical Significance

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) is a gram-positive bacterium (1) first isolated from the saliva of a patient with rabies by Pasteur in 1881. The chemical structure and antigenicity of the pneumococcal capsular polysaccharide and its association with virulence and its role in human disease were explained over the period of 1915 to 1945. The bacteria are lancet-shaped anaerobic organisms spreading by direct person-to-person contact via respiratory droplets and causing serious disease in humans: The 10 most common serotypes are estimated to account for about 62% of invasive disease worldwide (2). *S. pneumoniae* colonizes upper respiratory tract tissues causing severe pneumonia and mild/ acute earache/ otitis (3). Pneumococci cause 13% to 19% of all cases of bacterial meningitis in the United States (4). One-fourth of patients with pneumococcal meningitis also have pneumonia. Clinical symptoms are generally similar to those of 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 whereas *S. pneumoniae* has become the leading cause of bacterial meningitis among children younger than 5 years of age in the United States. Antibiotic treatment is efficient even if more penicillin-resistant strains have been identified (5). Several vaccines are available with variable efficiency depending on patient age or whether patients are developing some chronic illness or immunodeficiency. Nevertheless, vaccines have been demonstrated to provide protection against pneumococcal pneumonia (6).

### 3. Test Principle

The NADAL® S. pneumoniae Test is a qualitative rapid assay for the detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine without any dilution. The method employs a unique combination of monoclonal antibody-dye conjugate and monoclonal solid phase antibodies directed to different epitopes to selectively identify *Streptococcus pneumoniae* with a high degree of sensitivity. As the test sample is added, the labelled antibody-dye conjugate binds to the *S. pneumoniae* antigen forming an antibody-antigen complex. This complex binds to immobilized *S. pneumoniae* antibody in the test line region (T) producing a rose-pink-coloured line. In absence of *S. pneumoniae* in the sample, there will be no line present in the test line region (T). The reaction mixture continues flowing along the membrane.

Unbound conjugate binds to reagents in the control line region (C) producing a rose-pink-coloured line, indicating correct functioning of the test reagents and correct procedural technique.

### 4. Reagents and Materials Supplied

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

### 5. Additional Materials Required

- Urine collection container

### 6. Storage & Stability

Test kit components should be stored in the sealed foil pouch at room temperature (4-30°C). Do not freeze the test kit. The test is stable up to the expiry date stated on the foil pouch.

### 7. Warnings and Precautions

- The test is for professional *in-vitro* diagnostic use only.
- Read the package insert carefully before performing the test.
- Do not use the test after the expiration date stated on the foil pouch.
- 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 appropriate disposal of specimens.
- Wear protective clothing such as laboratory coats, disposable gloves and eye protection when specimens are being assayed.
- Humidity and temperature can adversely affect test results.

### 8. Specimen Collection and Preparation

Collect the urine specimen in a clean container free from detergent. If testing is not performed immediately, the specimen should be refrigerated (2-8°C) for up to 24 hours. In such case bring the specimen to room temperature prior to testing. If testing is delayed for more than 24 hours, the specimen should be frozen. The frozen specimen must be completely thawed, thoroughly mixed and brought to room temperature prior to testing. Avoid repeated freezing and thawing.

In case of doubt: It is possible to increase the sensitivity and specificity of the NADAL® S. pneumoniae Test through the following treatment of urine specimens:

- Heat a urine specimen at 100°C for 5 minutes.
  - Centrifuge it at 1000 g for 15 minutes.
  - Concentrate the supernatant using AMICON® ultra 4 centrifuge filter tubes until a 25x concentration is achieved.
- All treated/concentrated specimens should be tested following the same test procedure as for untreated specimens.

### 9. Test Procedure

**Bring samples and test cassettes to room temperature prior to testing.**

1. Remove the test cassette from the foil pouch.
2. Label the test cassette with a patient's name or control number.
3. Holding a pipette vertically, fill it with urine sample and

dispense 5 drops (200 µL) into the sample well (S) of the test cassette.

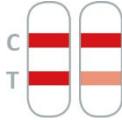
4. Read the test result after 10 minutes. Confirm negative test results after exactly 15 minutes. Do not interpret the result after more than 15 minutes.



## 10. Result Interpretation

### Positive:

In addition to the coloured line in the control line region (C) a clearly distinguishable coloured line appears in the test line region (T).



### Negative:

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



### Invalid:

If there is no distinct coloured line in the control line region (C), the test is invalid. It is recommended in this case that the test be repeated or a fresh urine specimen be obtained and tested later.



## 11. Quality Control

An internal procedural control is included in the test cassette:

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

## 12. Limitations

- The NADAL® S. pneumoniae Test is a screening test for the presence of *Streptococcus pneumoniae* in urine samples.
- As with any diagnostic procedure, the physician should evaluate the data obtained with the test in the light of other clinical information, including cell culture, if the results are inconsistent with the clinical presentation.
- The test does not differentiate between colonized and infected individuals.
- The NADAL® S. pneumoniae Test cannot distinguish different pneumococcal infections potentially induced by *Streptococcus pneumoniae*.
- Urine specimens with a high specific gravity (SG >1.030) may show false positive results with the NADAL® S. pneumoniae Test in rare cases.

## 13. Performance Characteristics

### Sensitivity and specificity

#### Diagnostic sensitivity and specificity

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

The NADAL® S. pneumoniae Test vs. the BinaxNOW® pneumoniae rapid test:

		BinaxNOW® Streptococcus pneumoniae rapid test (reference method)		
		+	-	Total
NADAL® S. pneumoniae Test	+	26	4	30
	-	7	21	28
Total		33	25	58

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

### Analytical sensitivity

Serial dilutions of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen were performed in negative urine. The dilutions were then tested using both the NADAL® S. pneumoniae Test and BinaxNOW® test. The results presented in the table below show that the NADAL® S. pneumoniae Test is more sensitive than BinaxNOW® test: while the NADAL® S. pneumoniae Test enables the detection of the *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen at a concentration of 35 µg/mL, the BinaxNOW® test only detects the antigen from a minimum concentration of 50 µg/mL.

Streptococcus pneumoniae urinary antigen	Results	
	NADAL® S. pneumoniae Test (after 10 minutes)	BinaxNOW® test (after 15 minutes)
25 (µg/mL)	-	-
30 (µg/mL)	-	-
35 (µg/mL)	+W	-
40 (µg/mL)	+	-
45 (µg/mL)	+	-
50 (µg/mL)	+	+W
100 (µg/mL)	+	+
200 (µg/mL)	+	+

+W = weak positive

### Cross-reactivity

Different strains of bacteria were tested using the NADAL® S. pneumoniae Test in order to determine whether they caused non-specific reactions (cross-reactions). The results are shown in the table.

Group	Result
S. pneumoniae capsular types (8)	Positive
Strep A, B, C, D, E, F, G & H	Negative
S. aureus	Negative
B. subtilis	Negative

### Intra-assay reproducibility

The intra-assay reproducibility was evaluated by running 10 replicates of 5 samples dilution having different *Streptococcus pneumoniae* concentrations. All the series showed converging results in conformance with the expected results.

Intra-lot reproducibility performance of the NADAL® S. pneumoniae Test is 100%.

#### 14. References

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiological Reviews*, 59 (4), 591 – 603, 1995.
2. CDC. Updated recommendations for preventionof invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). *MMWR*, 59 (34) : 1102-1106, 2010.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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, 2018-06-26 OM/KB

### 1. Domaine d'application

Le test NADAL® S. pneumoniae est un test rapide pour la détection qualitative de l'antigène de *Streptococcus pneumoniae* dans les urines non diluées. Il est conçu pour faciliter le diagnostic de la pneumonie, de la méningite et de l'otite.

### 2. Introduction et signification clinique

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) est une bactérie à Gram positif (1). Elle a été isolée pour la première fois en 1881 par Pasteur dans la salive d'un patient atteint de la rage. 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 aérobies. 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 (2). *S. pneumoniae* colonise les tissus des voies respiratoires supérieures provoquant des pneumonies aiguës, de légères/fortes douleurs aux oreilles et des otites (3). Les pneumocoques provoquent 13 à 19 % de tous les cas de méningite bactérienne aux Etats-Unis (4). 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, la *S. pneumoniae* est devenue 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(5). 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(6).

### 3. Principe du test

Le test NADAL® S. pneumoniae est un test rapide pour la détection qualitative des antigènes *Streptococcus pneumoniae* dans les urines non diluées. Cette méthode se base sur une combinaison spécifique d'anticorps monoclonaux marqués à des particules colorées et des anticorps monoclonaux en phase solide dirigée contre divers épitopes. Cette méthode permet de détecter les *Streptococcus pneumoniae* à une sensibilité élevée. Une fois le prélèvement déposé, le conjugué d'anticorps marqués aux particules colorées se lie aux antigènes *S. pneumoniae* pour former un complexe anticorps-antigènes. Ce complexe se lie aux anticorps *S. pneumoniae* immobilisés dans la zone de test pour former une ligne rose. Dans le cas d'absence de *S. pneumoniae* dans le prélèvement, aucune ligne n'apparaît dans la zone de test (T). Le mélange migre par capillarité le long de la membrane. Le conjugué non-lié réagit aux réactifs dans la zone de contrôle (C) pour former une ligne rose. Cette ligne indique

que les réactifs du test fonctionnent et que la manipulation a été correctement effectuée.

### 4. Matériel fourni

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

### 5. Matériel supplémentaire nécessaire

- Collecteur d'urine

### 6. Péréemption et conservation des réactifs

Les composants du kit peuvent être conservés dans leur emballage d'origine à température ambiante (4-30°C). Ne pas congeler le kit. Le test reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

### 7. Précautions et mesures de sécurité

- Test uniquement réservé au diagnostic *in-vitro* professionnel.
- Lire attentivement la notice d'utilisation avant de réaliser le test.
- Ne pas utiliser le test après la date de péremption indiquée sur l'emballage.
- 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 des 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.
- L'humidité et les fortes températures peuvent altérer les résultats du test.

### 8. Recueil et conservation des échantillons

Recueillir les urines dans un collecteur propre sans détergents. Si le test n'est pas réalisé immédiatement, il est conseillé de conserver les échantillons en milieu réfrigéré (2-8°C) jusqu'à 24h. Dans ce cas, amener les prélèvements à température ambiante avant de réaliser le test. Dans le cas où le test est réalisé plus de 24h après le recueil, congeler les prélèvements. Décongeler entièrement les prélèvements congelés avant de réaliser le test, puis les mélanger rigoureusement et les amener à température ambiante. Ne pas soumettre les prélèvements à des cycles répétés de congélation-décongélation.

En cas de doute : Il est possible d'optimiser la sensibilité et la spécificité du test NADAL® S. pneumoniae en réalisant les manipulations suivantes sur les échantillons d'urine :

- Chauffer l'échantillon d'urine pendant 5 minutes à 100°C.
- Centrifuger l'échantillon d'urine à 1 000 x g pendant 15 minutes.
- Concentrer le surnageant en le déposant dans un filtre à centrifuger AMICON® Ultra 4 jusqu'à atteindre un facteur de concentration de 25 fois.



Tous les échantillons traités/concentrés doivent être analysés selon le même procédé que des échantillons ordinaires.

### 9. Exécution du test

**Amener les prélèvements à température ambiante avant de réaliser le test.**

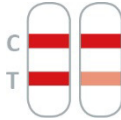
1. Retirer la cassette de son emballage.
2. Noter le nom du patient ou le numéro de contrôle sur la cassette.
3. Tenir la pipette à la verticale puis la remplir du prélèvement d'urine. Déposer 5 gouttes (200 µL) dans le puits de dépôt (S) de la cassette.
4. Interpréter le résultat du test au bout de 10 minutes. Confirmer les résultats négatifs après 15 minutes. Ne pas lire les résultats après plus de 15 minutes.



### 10. Interprétation des résultats

#### Positif :

En plus de la ligne colorée apparaissant dans la zone de contrôle (C), une ligne colorée distincte apparaît dans la zone de test (T).



#### Négatif :

Une ligne colorée apparaît au niveau de la zone de contrôle (C). Aucune ligne n'apparaît dans la zone de test (T).



#### Invalide :

Si aucune ligne colorée distincte n'apparaît dans la zone de contrôle (C), le test est invalide. Dans ce cas, il est recommandé de répéter le test ou d'effectuer un nouveau recueil de prélèvement et de réaliser le test ultérieurement.



### 11. Contrôle qualité

La cassette contient une procédure de contrôle interne :

La ligne colorée apparaissant dans la zone de contrôle (C) est considérée comme une procédure 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® S. pneumoniae est un test diagnostique pour la détection de *Streptococcus pneumoniae* dans les urines.
- Si les résultats des tests sont en contradiction avec les aspects cliniques, les informations obtenues par ce test doivent être confirmées par un médecin à l'aide d'analyses cliniques incluant des cultures cellulaires.
- Le test ne différencie pas les individus colonisés des individus infectés.

- Le test NADAL® S. pneumoniae ne différencie pas les multiples infections à pneumocoques causées potentiellement par *Streptococcus pneumoniae*.
- Les échantillons d'urine dont la densité est élevée ( $S > 1,030$ ) peuvent, dans de rares cas, générer des faux-positifs sur le test NADAL® S. pneumoniae.

### 13. Performance du test

#### Sensibilité et spécificité

#### Sensibilité et spécificité diagnostiques

Une étude comparative a été menée entre le test rapide BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae et le test NADAL® S. pneumoniae en utilisant 16 prélèvements d'urine fraîche et 42 prélèvements d'urine conservée.

Test NADAL® S. pneumoniae comparé au test rapide BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae.

Test NADAL® S. pneumoniae	Test rapide BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae (méthode de référence)			Total
	+	-		
	+	26	4	
-	7	21	28	
Total	33	25	58	

Au regard des résultats du tableau précédent, la sensibilité diagnostique du test NADAL® S. pneumoniae est de 79% (26/33) et sa spécificité est de 84% (21/25) en comparaison à la méthode de référence. La concordance générale est de 81% (47/58). Celle-ci est satisfaisante malgré le fait que la longue conservation de 42 prélèvements (33 positifs et 9 négatifs) ait pu entraîner la décomposition des antigènes *Streptococcus pneumoniae*.

#### Sensibilité analytique

Une série de dilution d'antigènes *Streptococcus pneumoniae* dans les urines a été réalisée sur des urines négatives. Ces dilutions ont été réalisées sur le test NADAL® S. pneumoniae ainsi que sur le test BinaxNOW®. Le tableau suivant montre que le test NADAL® S. pneumoniae est plus sensible que le test BinaxNOW®. En effet, le test NADAL® S. pneumoniae détecte les antigènes *Streptococcus pneumoniae* dans les urines à une concentration de 35 pg/mL. Le test BinaxNOW® détecte les antigènes seulement à partir d'une concentration de 50 pg/mL.

Antigènes <i>Streptococcus pneumoniae</i> dans les urines	Résultats	
	NADAL® S. pneumoniae (après 10 minutes)	BinaxNOW® (après 15 Minutes)
25 (pg/mL)	-	-
30 (pg/mL)	-	-
35 (pg/mL)	+W	-
40 (pg/mL)	+	-
45 (pg/mL)	+	-
50 (pg/mL)	+	+W
100 (pg/mL)	+	+
200 (pg/mL)	+	+

+W = faible positif (weak positive)

#### Réactions croisées

Plusieurs souches de bactéries ont été analysées en utilisant le test NADAL® S. pneumoniae afin de déterminer si le test ne cause pas de réactions spécifiques (réactions croisées).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Groupe	Résultats
types de capsules <i>S. pneumoniae</i> (8)	Positif
Strep A, B, C, D, E, F, G & H	Négatif
<i>S. aureus</i>	Négatif
<i>B. subtilis</i>	Négatif

#### Reproductibilité de l'intra-série

La reproductibilité de l'intra-série a été déterminée en utilisant 10 répliquas sur 5 prélèvements à diverses concentrations de *Streptococcus pneumoniae*. Toutes les séries ont indiqué des résultats convergents en conformité avec les résultats attendus.

La reproductibilité de l'intra-série du test NADAL® *S. pneumoniae* est de 100%.

#### 14. Bibliographie

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J., Snippe, H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
2. CDC. Updated recommendations for preventionof invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34) : 1102-1106, 2010.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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, 2018-06-26 PF

### 1. Uso previsto

El test NADAL® S. pneumoniae es un ensayo cualitativo rápido, destinado a la detección del antígeno *Streptococcus pneumoniae* en orina sin dilución, y sirve de ayuda en el diagnóstico de neumonía, meningitis y otitis media.

### 2. Introducción y significado clínico

El *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) es una bacteria gram-positiva (1) aislada por primera vez por Pasteur de la saliva de un paciente con rabia en el año 1881. La estructura química y la antigenicidad del polisacárido capsular neumocócico, se explicaron durante el periodo que va desde 1915 a 1945, así como su asociación con la virulencia y su papel en enfermedades humanas. Estas bacterias son organismos anaeróbicos con forma de lanceta, que se transmiten por contacto directo de persona a persona a través de las gotitas respiratorias, provocando serias enfermedades. Se estima que los 10 serotipos más comunes representan alrededor del 62% de las enfermedades invasivas de todo el mundo. El *S. pneumoniae* coloniza los tejidos del tracto respiratorio superior, provocando neumonía severa y dolor de oído u otitis media/aguda (3). El neumococo es el responsable del 13% al 19% de los casos de meningitis bacteriana en Estados Unidos (4). 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 el 12-16% de las enfermedades neumocócicas invasivas en niños de 2 años o más pequeños, 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 eficaz, incluso aunque se hayan identificado más cepas resistentes a la penicilina (5). Existen varias vacunas disponibles con eficacia variable en función de la edad del paciente, o de si desarrollan enfermedades crónicas o inmunodeficiencia. Sin embargo, se ha demostrado que las vacunas ofrecen protección contra la neumonía neumocócica (6).

### 3. Principio del test

El test NADAL® S. pneumoniae es un ensayo rápido cualitativo, para la detección del antígeno de *Streptococcus pneumoniae* en orina sin una dilución. El método emplea una única combinación de conjugado de anticuerpos monoclonales marcados con partículas coloreadas y anticuerpos monoclonales en fase sólida, dirigidos a epítomos diferentes para identificar selectivamente *Streptococcus pneumoniae* con un alto grado de sensibilidad. Una vez añadida la muestra al test, el conjugado de anticuerpos marcado con partículas coloreadas se une al antígeno *S. pneumoniae* formando un complejo anticuerpo-antígeno. Este complejo se une al anticuerpo *S. pneumoniae* en la región de la línea de test (T) generándose una línea de color rosa. Si no hay *S. pneumoniae* en la muestra, no aparece línea en el área de test (T). La mezcla continúa desplazándose a lo largo de la membrana hasta llegar a la región de la línea de control (C), donde el conjugado se une a los reactivos y se forma una línea de

control de color rosa, indicando que el test ha funcionado correctamente y que el procedimiento ha sido el adecuado.

### 4. Reactivos y materiales provistos

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

### 5. Otros materiales necesarios

- Recipiente para la recolección de la orina

### 6. Almacenamiento y conservación

Conserve el kit en su envase sellado a temperatura ambiente (4-30°C). No lo congele. El dispositivo se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada 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 el test después de la fecha de caducidad indicada en el envase.
- No debe utilizar el dispositivo si el envase está dañado.
- No coma, beba o fume durante la manipulación de las muestras y la realización del test.
- 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, durante la manipulación de las muestras y la realización del test.
- La humedad y la temperatura pueden afectar negativamente a los resultados.

### 8. Recolección de muestras y preparación

Recolecte la muestra de orina en un recipiente limpio sin detergente. Si no va a realizar el test inmediatamente, refrigere la muestra a 2-8°C durante un máximo de 24 horas. En ese caso, lleve la muestra a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Si no va a realizar la prueba antes de 24 horas, congele las muestras. En este caso, descongélas completamente, mézclelas bien y llévelas a temperatura ambiente antes de comenzar el test. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

En caso de duda: es posible aumentar la sensibilidad y especificidad del test NADAL® S. pneumoniae mediante el siguiente tratamiento de muestras de orina:

- Caliente una muestra de orina a 100°C durante 5 minutos.
- Centrifúguela a 1000 g durante 15 minutos.
- Concentre el sobrenadante utilizando tubos de filtro centrífugo AMICON® ultra 4 hasta lograr una concentración de 25x.

Todas las muestras tratadas/concentradas deben analizarse siguiendo el mismo procedimiento de test que las muestras no tratadas.

### 9. Procedimiento del test

**Lleve las muestras y los casetes de test a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.**

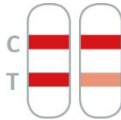
1. Retire el casete de test de su envase sellado.
2. Etiquete el casete con el nombre del paciente o número de control
3. Sostenga una pipeta verticalmente, llénela con la muestra de orina y añada 5 gotas (200 µL) en el pocillo de la muestra (S) del casete de test.
4. Lea los resultados del test a los 10 minutos. Confirme los resultados negativos después de exactamente 15 minutos. No los debe leer pasados 15 minutos.



**10. Interpretación de resultados**

**Positivo:**

Además de la línea coloreada de la región de control (C), aparece una línea coloreada en el área de test (T).



**Negativo:**

Aparece una línea coloreada en la región de control (C), pero no aparece ninguna línea en el área de test (T).



**No válido:**

Si no aparece una línea coloreada en el área de control (C), el test no se considera válido. En este caso se recomienda repetir el test, o recolectar una nueva muestra de orina para repetir la prueba después.



**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 suficiente, que la membrana ha reaccionado correctamente y que el procedimiento ha sido el adecuado.

**12. Limitaciones**

- El test NADAL® S. pneumoniae es un test de detección de la presencia de *Streptococcus pneumoniae* en muestras de orina.
- Al igual que con cualquier proceso de diagnóstico, los resultados del test deben ser evaluados por el personal médico, junto con toda la información clínica, incluyendo cultivo de células si los resultados no concuerdan con la presentación clínica.
- El test no diferencia entre individuos portadores y enfermos.
- Tampoco distingue entre las diferentes infecciones neumocócicas potencialmente inducidas por *Streptococcus pneumoniae*.
- En algún caso, aunque raramente, las muestras de orina con una densidad relativa alta (SG> 1030) pueden mostrar resultados falsos positivos con el test NADAL® S. pneumoniae.

**13. Características de rendimiento**

**Sensibilidad y especificidad**

**Sensibilidad y especificidad diagnóstica**

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

El test NADAL® S. pneumoniae vs. el test rápido BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae:

		Test rápido BinaxNOW® pneumoniae (método de referencia)		
		+	-	Total
Test NADAL® S. pneumoniae	+	26	4	30
	-	7	21	28
	Total	33	25	58

Como se observa en la tabla anterior, la sensibilidad de diagnóstico del test NADAL® S. pneumoniae es del 79%, 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 42 muestras (33 positivo y 9 negativo) podría haber causado la degradación de los antígenos de *Streptococcus pneumoniae*.

**Sensibilidad analítica**

Se realizaron diluciones en serie del antígeno urinario de *Streptococcus pneumoniae* en orina negativa. Se analizaron después las diluciones con el test NADAL® S. pneumoniae y el test BinaxNOW®. Los resultados presentados en la tabla a continuación muestran que el test NADAL® S.pneumoniae es más sensible que el test BinaxNOW®: mientras que el test NADAL® S. pneumoniae permite la detección del antígeno urinario de *Streptococcus pneumoniae* en una concentración de 35 pg/mL, el test BinaxNOW® solo detecta el antígeno a una concentración mínima de 50 pg/mL.

Antígeno urinario de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Resultados	
	Test NADAL® S. pneumoniae (después de 10 minutos)	Test BinaxNOW® (después de 15 minutos)
25 (pg/mL)	-	-
30 (pg/mL)	-	-
35 (pg/mL)	+W	-
40 (pg/mL)	+	-
45 (pg/mL)	+	-
50 (pg/mL)	+	+W
100 (pg/mL)	+	+
200 (pg/mL)	+	+

**+W = positivo débil**

**Reacciones cruzadas**

Se analizaron diferentes cepas de la bacteria utilizando el test NADAL® S. pneumoniae para determinar si se producen reacciones no específicas (reacciones cruzadas). En la siguiente tabla se muestran los resultados:

Grupo	Resultado
<i>S. pneumoniae</i> tipo capsular (8)	Positivo
Strept A, B, C, D, E, F, G, & H	Negativo
<i>S. aureus</i>	Negativo
<i>B. subtilis</i>	Negativo

### 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, en conformidad con los resultados esperados.

La reproducibilidad intralote del test NADAL® S. pneumoniae es del 100%.

### 14. Referencias

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
2. CDC. Updated recommendations for preventionof invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34) : 1102-1106, 2010.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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, 2018-06-26 MP

### 1. Scopo del test

Il test NADAL® S. pneumoniae è un test qualitativo rapido per la rilevazione degli antigeni della *polmonite streptococcica* in urina non diluita e come coadiuvante nella diagnosi di polmoniti, meningiti e otiti.

### 2. Introduzione e Significato Clinico

Lo *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) è un batterio gram-positivo (1) isolato per la prima volta da Pasteur nel 1881. Il batterio fu prelevato dalla saliva di un paziente affetto da rabbia. La struttura chimica e antigenetica del polisaccaride capsulare pneumococco, la scoperta della sua virulenza e il conseguente ruolo di causa di malattie nell'uomo furono resi noti tra il 1915 ed il 1945. Tali batteri sono organismi anaerobici caratterizzati da una tipica forma a "fiamma" e si diffondono attraverso il contatto diretto con secrezioni respiratorie da persona a persona causando così serie malattie nell'uomo: i 10 serotipi maggiormente conosciuti sono considerati responsabili di circa il 62% delle malattie invasive nel mondo (2). L'*S. pneumoniae* colonizza i tessuti del tratto respiratorio superiore causando gravi polmoniti e lievi/acute otalgie/otiti (3). I pneumococchi causano tra il 13% ed il 19% di tutte le meningiti batteriche negli Stati Uniti (4). Un quarto dei pazienti affetti da meningiti pneumococciche sono 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 l'*S. 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 ancora i più efficaci anche se sono stati identificati numerosi ceppi resistenti alla penicillina (5). Sono disponibili diversi vaccini il cui livello di efficacia varia a seconda dell'età del paziente o nel caso in cui i pazienti abbiano sviluppato malattie croniche o immunodeficienza. In ogni caso è stato dimostrato che i vaccini forniscono una efficace protezione contro la polmonite pneumococcica (6).

### 3. Principio del Test

Il test NADAL® S. pneumoniae è un test qualitativo rapido per la rilevazione degli antigeni dello *Streptococcus pneumoniae* in campioni di urina non diluiti. Questo metodo impiega la singolare combinazione del coniugato anticorpo monoclonale-colorante e anticorpi monoclonali in fase solida diretti verso differenti epitopi al fine di identificare selettivamente lo *Streptococcus pneumoniae* garantendo un elevato grado di sensibilità. Nel momento in cui il campione del test viene aggiunto, il coniugato anticorpo-colorante si lega agli antigeni dell'*S. pneumoniae* formando un complesso anticorpi-antigeni. Questo complesso si lega agli anticorpi *S. pneumoniae* immobilizzati nella regione della linea del test (T) producendo una linea di colore rosato. In caso di assenza di *S. pneumoniae* nel campione la linea del test (T) non compare. Il complesso continua a migrare lungo la membrana.

Il coniugato libero si lega ai reagenti sulla regione della linea di controllo (C) producendo una linea di colore rosa indicando il corretto funzionamento dei reagenti del test ed il corretto impiego delle tecniche procedurali.

### 4. Reagenti e Materiali Forniti

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

### 5. Ulteriori materiali richiesti

- Contenitore per la raccolta dell'urina

### 6. Conservazione e Stabilità

I componenti del kit vanno conservati nella loro confezione a temperatura ambiente (4-30°C). Non congelare i test. I test rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

### 7. Avvertenze e Precauzioni

- Il test è pensato esclusivamente per uso diagnostico professionale *in-vitro*.
- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di eseguire il test.
- Non utilizzare il test oltre la data di scadenza riportata sulla confezione.
- 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.
- 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. 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. Evitare il congelamento e scongelamento ripetuto dei campioni.

In caso di dubbi: è possibile aumentare la sensibilità e specificità del test NADAL® S. pneumoniae intraprendendo il seguente trattamento dei campioni di urina:

- Scaldare il campione di urina a 100° per 5 minuti
- Centrifugarlo a 1000g per 15 minuti
- Concentrare il supernatante utilizzando le Unità di filtrazione per centrifughe AMICON® ultra 4 fino a raggiungere una concentrazione a 25x.

Tutti i campioni trattati/concentrati, dovrebbero essere analizzati seguendo la stessa procedura del test che per i campioni non trattati.

### 9. Procedura del Test

**Portare i campioni ed i test a cassetta a temperatura ambiente prima di eseguire il test.**

1. Rimuovere il test a cassetta dalla sua confezione.

2. Etichettare i test con il nome del paziente o con il codice identificativo.

3. Mantenere la pipetta verticalmente e riempirla con il campione di urina. Versare 5 gocce (200 µL) nel pozzetto di raccolta del campione (S) del test a cassetta.

4. Leggere il risultato del test entro 10 minuti. Confermare i risultati negativi dopo esattamente 15 minuti. Non interpretare i risultati dopo 15 minuti.



10 min

### 10. Interpretazione dei Risultati

#### Positivo:

Insieme alla linea colorata nella regione della linea di controllo del test (C) compare una linea colorata chiaramente visibile nella regione della linea del test (T).



#### 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:

Nel caso in cui non compare alcuna linea nella regione della linea di controllo (C), il test è da considerarsi non valido. In tal caso si consiglia di ripetere il test o raccogliere un nuovo campione di urina ed eseguire il test successivamente.



### 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® S. pneumoniae è un test di screening per la rilevazione della presenza di *Streptococcus pneumoniae* in campioni di urina.
- Come per qualsiasi procedura diagnostica, il medico dovrebbe valutare i risultati ottenuti alla luce di ulteriori informazioni cliniche incluse colture cellulari, nel caso in cui i risultati dovessero essere discordanti con il quadro clinico.

- Il test non è in grado di distinguere tra colonizzazione ed infezione.
- Il test NADAL® S. pneumoniae non è in grado di distinguere tra differenti tipi di infezioni pneumococciche potenzialmente indotte dallo *Streptococcus pneumoniae*.
- I campioni di urina con una gravità specifica alta (SG >1,030) potrebbero, in rari casi, mostrare dei falsi risultati positivi con il test NADAL® S. pneumoniae.

### 13. Caratteristiche Tecniche

#### Sensibilità e specificità

#### Sensibilità e specificità diagnostica

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

Test NADAL® S. pneumoniae vs. Test rapido BinaxNOW® polmonite.

	Test rapido polmonite BinaxNOW® (metodo di riferimento)			
	+	-	Totale	
Test NADAL® S. pneumoniae	+	26	4	30
	-	7	21	28
	Totale	33	25	58

In base al totale riportato sopra, la sensibilità diagnostica del test NADAL® S. pneumoniae è del 79% (26/23) 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*.

#### Sensibilità analitica

La diluizione seriale degli antigeni urinary di *Streptococcus pneumoniae* è stata svolta in campioni negativi di urina. Le diluizioni sono state poi analizzate utilizzando sia il test NADAL® S. pneumoniae che il test BinaxNOW®. I risultati riportati nella tabella sotto mostrano che il test NADAL® S. pneumoniae è più sensibile rispetto al test BinaxNOW®: mentre il test NADAL® S. pneumoniae permette la rilevazione dell'antigene urinario *Streptococcus pneumoniae* ad una concentrazione di 35 pg/mL, il test BinaxNOW® lo individua solo ad una concentrazione minima di 50 pg/mL.

<i>Streptococcus pneumoniae</i> antigene urinario	Risultati	
	Test NADAL® S. pneumoniae (dopo 10 minuti)	Test BinaxNOW® (dopo 15 minuti)
25 (pg/mL)	-	-
30 (pg/mL)	-	-
35 (pg/mL)	+W	-
40 (pg/mL)	+	-
45 (pg/mL)	+	-
50 (pg/mL)	+	+W
100 (pg/mL)	+	+
200 (pg/mL)	+	+

+W = basso positivo

### Reattività incrociata

Sono stati analizzati diversi ceppi di batteri utilizzando il test NADAL® 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
<b>S. pneumoniae tipo capsulare (8)</b>	<b>Positivo</b>
<b>Strep A, B, C, D, E, F, G &amp; H</b>	<b>Negativo</b>
<b>S. aureus</b>	<b>Negativo</b>
<b>B. subtilis</b>	<b>Negativo</b>

### Riproducibilità intra-test

La riproducibilità intra-test è stata valutata eseguendo 10 ripetizioni su 5 diluizioni di campioni con differenti concentrazioni di *Streptococcus pneumoniae*. Tutte le ripetizioni hanno mostrato risultati conformi ai risultati attesi.

La riproducibilità intra-lotto del test NADAL® S. pneumoniae è del 100%.

### 14. Bibliografia

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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, 2018-06-26 BN



### 1. Zastosowanie

Test NADAL® S. pneumoniae jest jakościowym szybkim testem do oznaczania antygenu *Streptococcus pneumoniae*- w moczu bez rozcieńczenia oraz stosowany jest jako środek pomocniczy przy diagnozowaniu zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowych oraz zapalenia ucha środkowego.

### 2. Wprowadzenie i znaczenie diagnostyczne

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) jest gram dodatnią bakterią (1), która po raz pierwszy wyizolowana została w roku 1881, ze śliny pacjenta ze wścieklicznaj Pasteura. Chemiczna struktura i antygenność polisacharydu otoczki pneumokokowej, jak również jego połączenie z chorobotwórczością i jego rola przy ludzkich chorobach, zostały wyjaśnione w okresie pomiędzy 1915 i 1945. Bakterie to lancetowate organizmy beztlenowe, które przenoszone są z człowieka na człowieka, poprzez bezpośredni kontakt kropelkową drogą oddechową i wywołują u człowieka ciężkie choroby: Szacuje się, że 10 najczęstszych serotypów, odpowiedzialne jest za 62% inwazyjnych chorób na całym świecie (2). *S. pneumoniae* osiada kolonie górnych dróg oddechowych i powoduje ciężkie zapalenie płuc i słabe/ostre bóle uszu/ zapalenie ucha (3). Pneumokokki powodują 13% do 19% wszystkich przypadków bakteryjnego zapalenia opon mózgowych w Stanach Zjednoczonych (4). Jedną czwartą 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, objawy czaszkowe 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. Terapia antybiotykowa jest skuteczna, nawet, gdy zidentyfikowanych zostało coraz więcej szczepów odpornych na penicylinę. Dostępnych jest wiele szczepionek z różną skutecznością, w zależności od wieku pacjenta lub od tego, czy pacjent cierpi na choroby przewlekłe lub niedobór odporności. Pomimo wszystko udowodniono, że szczepionki przeciwko pneumokokowemu zapaleniu płuc, są skuteczne.

### 3. Zasada działania testu

Test NADAL® S. pneumoniae jest jakościowym szybkim testem do oznaczania antygenu *Streptococcus pneumoniae*- w moczu bez rozcieńczenia. Metoda ta stosuje unikatową kombinację monoklonalnego barwnikowego konjugatu i monoklonalnych przeciwciał w fazie stałej, przeciwko różnym epitopom, aby selektywnie i z wysoką czułością rozpoznać *Streptococcus pneumoniae*. W momencie gdy próbka jest nakładana, zaznaczony konjugat barwnika przeciwciała wiąże antygen *S. pneumoniae* i tworzy kompleks przeciwciało-antygen. Ten kompleks wiąże się wówczas z unieruchomionym przeciwciałem *S. pneumoniae* w obszarze linii testowej (T) i wytwarza różową linię. W przypadku braku *S. pneumoniae* w próbce, w obszarze linii testowej (T) nie pojawi się żadna linia. Mieszana reakcyjna wędruje dalej wzdłuż membrany. Niezwiązany konjugat wiąże się z odczynnikami w obszarze

linii kontrolnej (C) i tworzy różową linię, która wskazuje, że odczynniki testowe funkcjonują właściwie i sposób wykonania testu był prawidłowy.

### 4. Materiały zawarte w zestawie

- 10 kaset testowych NADAL® S. pneumoniae (wraz z jednorazowymi pipetami)
- 1 instrukcja obsługi

### 5. Dodatkowe potrzebne materiały

- Pojemnik na mocz

### 6. Data ważności i przechowywanie

Elementy zestawu testowego mogą być przechowywane w zamkniętym opakowaniu foliowym, w temperaturze pokojowej (4-30°C). Zestawów testowych nie należy zamrażać. Test jest stabilny do daty użyteczności podanej na opakowaniu foliowym.

### 7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Test przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnej diagnostyki *in-vitro*.
- Przed przeprowadzeniem testu należy uważnie przeczytać instrukcję obsługi.
- Testu nie należy używać po upływie daty ważności podanej na opakowaniu foliowym.
- Nie używać testu, jeżeli opakowanie foliowe jest uszkodzone.
- Nie należy jeść, pić lub palić papierosów w obszarze, w którym pracuje się z próbkami oraz zestawami testowymi.
- Należy traktować wszystkie próbki tak, jakby zawierały odczynnik zakaźny.
- 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, należy stosować odzież ochronną, taką jak fartuch, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne.
- Wilgoty oraz wysokie temperatury mogą mieć wpływ na wyniki testu.

### 8. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

Próbkę moczu należy pobrać do czystego pojemnika bez środków czyszczących.

Jeżeli przeprowadzenie testu nie zostanie przeprowadzone od razu, to próbki powinny być przechowywane do 24 godzin w chłodnej temperaturze (2-8°C). W tym przypadku należy przed przeprowadzeniem testu doprowadzić próbkę do temperatury pokojowej. Jeżeli przeprowadzenie testu zostanie przesunięte o więcej niż 24 godziny, to próbki powinny być zamrożone. Zamrożone próbki powinny być przed przeprowadzeniem testu w zupełności rozmrożone, dobrze wymieszane i przywrócone do temperatury pokojowej. Należy unikać powtórnego rozmrażania i zamrażania.

W przypadku wątpliwości: Możliwe jest zwiększenie czułości i swoistości NADAL® S. pneumoniae w celu zwiększenia skuteczności poprzez następujące czynności z próbkami moczu:

- Podgrzewać próbkę moczu przez 5 minut w temperaturze 100°C.

- Wirować przez 15 minut przy 1000 g.
- Zatężyć supernatant za pomocą próbek AMICON® ultra 4 do wirówek, aż osiągnie 25-krotne stężenie.

Wszystkie poddane obróbcie/skoncentrowane próbki powinny być badane zgodnie tą samą procedurą badania, jak dla próbek nietraktowanych.

### 9. Przeprowadzanie testu

Przed przeprowadzeniem testu, należy doprowadzić próbki i kasety testowe do temperatury pokojowej.

1. Należy wyciągnąć kasetę testową z opakowania foliowego.

2. Kasety testowe należy opisać nazwiskiem pacjenta oraz numerem kontrolnym.

3. Pipetę należy trzymać pionowo, napełnić ją moczem i zaaplikować 5 kropli (200 µL) próbki moczu w zagłębienie próbki (S) kasety testowej.

4. Wynik testu należy odczytać po 10 minutach. Potwierdzić wyniki negatywne po upływie dokładnie 15 minut. Po czasie dłuższym niż 15 minut, nie należy odczytywać wyników.



10 min

### 10. Interpretacja wyników

#### Pozytywny:

Dodatkowo do kolorowej linii w obszarze linii kontrolnej (C) pojawia się wyraźna linia w obszarze linii testowej (T).



#### Negatywny:

W obszarze linii kontrolnej (C) pojawia się kolorowa linia. W obszarze linii testowej (T) nie pojawia się kolorowa linia.



#### Nieważny:

Jeżeli w obszarze linii kontrolnej, nie pojawi się linia, to test jest nieważny. W tym przypadku, zaleca się ponowne przeprowadzenie testu lub ponowne zebranie próbki moczu i późniejsze przetestowanie.



### 11. Kontrola jakości

Test kasetowy 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® S. pneumoniae jest testem skriningowym do wykrywania *Streptococcus pneumoniae* w próbkach moczu.
- Jak przy wszystkich metodach diagnostycznych, dane otrzymane przy zastosowaniu tego testu, powinny zostać potwierdzone przez lekarza w połączeniu z innymi informacjami klinicznymi, łącznie z kulturami komórek, jeżeli wyniki testu są sprzeczne z klinicznym obrazem.

- Test nie rozróżnia pomiędzy nosicielami i osobami zainfekowanymi.
- Test NADAL® S. pneumoniae nie może rozróżnić różnych potencjalnych infekcji pneumokoków, które potencjalnie spowodowane zostały *Streptococcus pneumoniae*.
- W nielicznych przypadkach próbki moczu o wysokiej gęstości właściwej (SG >1,030) mogą powodować wyniki fałszywie dodatnie, podczas używania testu NADAL® S. pneumoniae.

### 13. Charakterystyka testu

#### Czułość i swoistość

#### Diagnostyczna czułość i swoistość

Przy zastosowaniu panelu 16 świeżych i 42 przechowywanych próbek, przeprowadzone zostało badanie porównawcze pomiędzy szybkim testem BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae i testem NADAL® S. pneumoniae.

Test NADAL® S. pneumoniae kontra szybki test BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae.

		Szybki test BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae (metoda referencyjna)		
		+	-	Suma
NADAL® Test S. pneumoniae	+	26	4	30
	-	7	21	28
Suma		33	25	58

Jak można wyczytać z wyżej wymienionej tabeli, diagnostyczna czułość testu NADAL® S. pneumoniae wynosi 79% (26/33) a jego swoistość 84% (21/25) w porównaniu do metody referencyjnej. Ogólna zgodność wynosi 81% (47/58) i jest zadowalająca pomimo faktu, że poprzez długotrwałe przechowywanie 42 próbek (33 pozytywnych i 9 negatywnych), możliwe jest wystąpienie rozkładu antygenów *Streptococcus pneumoniae*.

#### Czułość analityczna

Seryjne rozcieńczenia antygeny *Streptococcus pneumoniae* w moczu zostało przeprowadzone z ujemnym moczem. Następnie wykonano rozcieńczenia za pomocą testu NADAL® S. pneumoniae oraz za pomocą testu BinaxNOW®. Wyniki przedstawione w poniższej tabeli pokazują, że test NADAL® S. pneumoniae jest bardziej czuły niż test BinaxNOW®: podczas, gdy test NADAL® S. pneumoniae umożliwia wykrywanie antygeny *Streptococcus pneumoniae* w moczu przy stężeniu 35 pg/ml, test BinaxNOW® wykrywa antygen tylko przy minimalnym stężeniu 50 pg/ml.

Streptococcus pneumoniae Antygen w moczu	Wyniki	
	NADAL® S. pneumoniae Test (po 10 minutach)	BinaxNOW® Test (po 15 minutach)
25 (pg/mL)	-	-
30 (pg/mL)	-	-
35 (pg/mL)	+W	-
40 (pg/mL)	+	-
45 (pg/mL)	+	-
50 (pg/mL)	+	+W
100 (pg/mL)	+	+
200 (pg/mL)	+	+

+W = słabo pozytywne (weak positive)

### Reakcje krzyżowe

Różne szczepy bakterii zostały przetestowane przy zastosowaniu testu NADAL® *S. pneumoniae*, w celu sprawdzenia, czy nie spowodują pewnych, niespecyficznych reakcji (reakcji krzyżowych).

Wyniki zostały przedstawione w tabeli.

Grupa	Wynik
Typy kapsulek <i>S. pneumoniae</i> (8)	Pozytywny
Strep A, B, C, D, E, F, G & H	Negatywny
<i>S. aureus</i>	Negatywny
<i>B. subtilis</i>	Negatywny

### Powtarzalność wewnątrzseryjna

Reproduktywność wewnątrzseryjna została ustalona na podstawie 10 replikatów z 5 próbek o różnych koncentracjach *Streptococcus pneumoniae*. Wszystkie serie były zbieżne wynikiem, zgodnie z oczekiwanymi rezultatami.

Powtarzalność wewnątrzseryjna testu NADAL® *S. pneumoniae* wynosi 100%.

### 14. Bibliografia

1. AlonsoDeVelasco, E., Verheul,A.F.,Verhoen, J, Snippe, H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiological Reviews, 59 (4), 591 – 603, 1995.
2. CDC. Updated recommendations for preventionof invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34) : 1102-1106, 2010.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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, 2018-06-26 AM

### 1. Utilização prevista

O teste cassete NADAL® S. pneumoniae é um teste rápido para a detecção qualitativa do antígeno de Streptococcus Pneumoniae em amostras de urina não diluídas. Foi concebido para facilitar o diagnóstico da pneumonia, da meningite e da otite.

### 2. Introdução e significância clínica

O Streptococcus Pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva. Foi isolada pela primeira vez em 1881 por Pasteur na saliva de um paciente com raiva. Entre 1915 e 1945, foram explicados a estrutura química, a antigenicidade, os factores de virulência e o papel dentro das patologias humanas do polissacarídeo capsular pneumococo. As bactérias são organismos anaeróbicos em forma de lanceta, que se transmitem por contacto directo de pessoa em pessoa através das gotas respiratórias, provocando doenças sérias. Estima-se que os 10 serótipos mais comuns representem 62% das doenças invasivas de todo o mundo. O Streptococcus Pneumoniae coloniza os tecidos do tracto respiratório superior, provocando pneumonia severa e dores de ouvido ou otite média/aguda. O pneumococo é responsável por 13%-19% dos casos de meningite bacteriana nos Estados Unidos. Um quarto dos pacientes com meningite pneumocócica têm também pneumonia. Os sintomas clínicos são, geralmente, semelhantes aos de outras formas de meningite bacteriana purulenta, incluindo dor de cabeça, letargia, vómitos, irritabilidade, febre, rigidez da nuca, manchas craneais, convulsões e coma. A letalidade da meningite ronda os 30%, podendo atingir os 80% em idosos. A pneumonia bacteriana representa 12%-16% das doenças pneumocócicas invasivas em crianças até aos 2 anos, enquanto que a Streptococcus Pneumoniae se converteu na principal causa de meningite bacteriana em crianças até aos 5 anos nos Estados Unidos. O tratamento antibiótico é eficaz, ainda que se tenham encontrado alguns tipos resistentes à penicilina (5). Existem várias vacinas disponíveis com eficácia variável em função da idade do paciente, ou de se tratar de uma doença crónica ou de uma imunodeficiência. Não obstante, demonstrou-se que as vacinas oferecem protecção contra a pneumonia pneumocócica (6).

### 3. Princípio do teste

O teste NADAL® S. pneumoniae é um imunoenensaio qualitativo de fluxo lateral para a detecção do antígeno de Streptococcus Pneumoniae em urina não diluída. O método emprega uma única combinação de conjugado de anticorpos monoclonais marcados com partículas coloridas e anticorpos monoclonais em estado sólido, dirigidos a epitopos diferentes para identificar selectivamente *Streptococcus Pneumoniae* com um alto nível de sensibilidade. Uma vez acrescentada a amostra ao teste, o conjugado de anticorpos marcado com partículas coloridas une-se ao antígeno *Streptococcus Pneumoniae* formando um complexo anticorpo-antigene. Este complexo une-se ao anticorpo *Streptococcus Pneumoniae* na região da linha de teste (T), gerando uma linha de cor rosada. Na ausência de S. *Pneumoniae* na amostra, não aparecerá qualquer linha na região de teste. O complexo continua a migrar na membrana até atingir a região da linha de controlo (C), onde se une aos reagentes e se forma uma linha de cor

rosada, indicando que o teste foi executado correctamente e que o procedimento foi o adequado.

### 4. Reagentes e materiais fornecidos

- 10 testes cassete NADAL® S. pneumoniae (embalados individualmente, incluindo pipetas descartáveis)
- Instruções de utilização

### 5. Material adicional necessário

- Recipiente para a recolha de urina
- Relógio ou cronómetro

### 6. Conservação e armazenamento

As cassetes de teste encontram-se prontas para utilização conforme fornecidas e devem ser armazenadas conforme embaladas, à temperatura ambiente ou refrigeradas (entre 2-30°C). Não expor os dispositivos a temperaturas superiores a 40°C. Não congelar. O teste deve manter-se na embalagem selada até à sua utilização. Não utilizar uma vez expirado o prazo de validade.

### 7. Advertências e precauções

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in-vitro*.
- O manual de instruções deve ser lido na íntegra antes da realização do teste. O não cumprimento das instruções levará a resultados erróneos.
- Não abrir a embalagem do teste antes da realização do mesmo.
- Não utilizar testes cujo prazo de validade tenha expirado.
- Apenas para uma utilização.
- Não utilizar componentes de outros kits para substituir o kit em utilização.
- Utilizar vestuário de proteção, luvas descartáveis e proteção ocular durante todo o procedimento de teste.
- Não comer, beber ou fumar na área de manuseamento das amostras ou dos testes.
- O teste utilizado deve ser descartado de acordo com as regulamentações locais.
- Manusear todas as amostras como se contivessem agentes infecciosos. O mesmo se aplica para os controlos positivo e negativo (se aplicável)
- Respeitar as precauções estabelecidas contra riscos microbiológicos durante todos os procedimentos até à eliminação das amostras enquanto resíduos químicos.
- Oscilações de humidade ou de temperatura poderão influenciar o resultado dos testes.

### 8. Preparação, recolha e conservação da amostra

Recolher a amostra de urina num recipiente limpo sem detergente. Se não for realizado o teste imediatamente, refrigerar a amostra entre 2-8°C durante um período máximo de 24 horas. Nesse caso, voltar a deixar a amostra atingir a temperatura ambiente antes de realizar o teste. Se souber que não irá realizar o teste antes de decorridas 24 horas, congelar as amostras. Nesse caso, descongelá-las correctamente deixando-as atingir a temperatura ambiente e misturando bem antes de iniciar o teste. Evitar congelar e descongelar repetidamente as amostras.

Em caso de dúvida: É possível aumentar a sensibilidade e especificidade do teste NADAL® S. pneumoniae através do seguinte tratamento de amostras de urina:

- Aqueça uma amostra de urina a 100°C por 5 minutos.
- Centrifugar a 1000g por 15 minutos.
- Concentrar o sobrenadante usando os tubos de filtro de centrifuga AMICON® ultra 4 até atingir uma concentração de 25x.

Todas as amostras tratadas/concentradas devem ser testadas seguindo o mesmo procedimento de teste que as amostras não tratadas.

**9. Procedimento do teste**

O teste e a amostra devem encontrar-se à temperatura ambiente (15-30°C) antes da realização do teste.

1. Retirar o teste da embalagem protetora.
2. Etiquetar o teste cassetete com a identificação do paciente ou o número de controlo.
3. Recolher, com uma pipeta, a urina, colocando 5 gotas (200 µL) no orifício de amostra (S) na cassetete de teste.
4. Interpretar os resultados após 10 minutos. Confirmar os resultados de teste negativos após exactamente 15 minutos. Não interpretar os resultados após decorridos mais de 15 minutos.



**10. Interpretação dos resultados**

**Positivo:**

Surgem duas linhas coloridas. Uma na área da linha de controlo (C), outra na de teste (T).



**Negativo:**

Surge uma linha colorida na área de controlo (C). Na área de teste não se detecta qualquer linha.



**Inválido:**

Não surge linha de controlo. Neste caso o teste deverá ser considerado inválido. As principais causas para este resultado são volume de amostra insuficiente, testes expirados, ou procedimento erróneo. Verificar o procedimento e repetir o teste com uma nova cassetete. Caso o problema persista, não continuar a utilização deste kit e contactar o distribuidor.



**11. Controlo de qualidade**

O controlo do bom desempenho do teste é garantido através da existência da área de controlo do teste. Caso surja uma linha colorida na área de controlo, o bom desempenho do teste é confirmado.

**12. Limitações do teste**

- O teste NADAL® S. pneumoniae é entendido apenas para a utilização de diagnóstico *in-vitro*. O teste serve apenas para comprovar a presença de *S. pneumoniae* em amostras de urina.
- A quantificação ou a concentração de antígenos não é possível realizar com este teste qualitativo.
- Como com qualquer outro procedimento diagnóstico, o médico deverá confirmar os resultados apoiando-se noutras informações clínicas, inclusivamente através de culturas celulares, no caso de os resultados serem discordantes do quadro clínico.
- O teste não diferencia entre indivíduos portadores e indivíduos contaminados, nem as diferentes infecções pneumocócicas potencialmente induzidas por *S. pneumoniae*.
- Amostras de urina com alta gravidade específica (SG> 1,030) podem apresentar, em raros casos, resultados falso-positivos com o teste NADAL® S. pneumoniae.

**13. Características de desempenho**

**Sensibilidade e especificidade**

**Sensibilidade diagnosticada e especificidade**

Foi realizado um estudo comparativo entre o teste rápido BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae e o teste NADAL® S. pneumoniae utilizando um painel de 16 amostras de urina fresca e 42 amostras de urina congelada. O teste NADAL® S. pneumoniae vs. o teste BinaxNOW® Streptococcus Pneumoniae:

	Teste rápido BinaxNOW® S. pneumoniae (método de referência)			
	+	-	Total	
Teste NADAL® S. pneumoniae	+	26	4	30
	-	7	21	28
	Total	33	25	58

Como se observa na tabela anterior, a sensibilidade de diagnóstico do Teste NADAL® S. pneumoniae é de 79% e a especificidade 84% (21/25) comparando com o método de referência. O acordo geral é de 81% (47/58), e é satisfatório, apesar de que um armazenamento prolongado de 42 amostras (33 positivas e 9 negativas) poderia ter causado a degradação dos antígenos de *S. pneumoniae*.

**Sensibilidade analítica**

Foram realizadas diluições em série do antígeno urinário de *Streptococcus pneumoniae* em urina negativa. As diluições foram então testadas com ambos os testes NADAL® S. pneumoniae e BinaxNOW®. Os resultados apresentados na tabela abaixo mostram que o teste NADAL® S. pneumoniae é mais sensível que o teste BinaxNOW®: enquanto o teste NADAL® S. pneumoniae permite a detecção do antígeno urinário de *Streptococcus pneumoniae* em uma concentração de 35 pg/mL, o teste BinaxNOW® detecta apenas o antígeno a partir de uma concentração mínima de 50 pg/mL.

Antigénio urinário <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Resultados	
	Teste NADAL® <i>S. pneumoniae</i> (após 10 minutos)	Teste BinaxNOW® (após 15 minutos)
25 (pg/mL)	-	-
30 (pg/mL)	-	-
35 (pg/mL)	+W	-
40 (pg/mL)	+	-
45 (pg/mL)	+	-
50 (pg/mL)	+	+W
100 (pg/mL)	+	+
200 (pg/mL)	+	+

+W = positive fraco

#### Reacções cruzadas

Realizaram-se diferentes tipos de bactéria utilizando o teste NADAL® *S. pneumoniae* para determinar se se produzem reacções específicas (reacções cruzadas).

Na seguinte tabela revelam-se os resultados:

Grupo	Resultado
<i>S. pneumoniae</i> tipo capsular (8)	Positivo
Strep A, B, C, D, E, F, G, & H	Negativo
<i>S. aureus</i>	Negativo
<i>B. subtilis</i>	Negativo

#### Reprodutibilidade interensaio











Avaliou-se a reprodutibilidade interensaio perante 10 réplicas de 5 diluições de amostras com diferentes concentrações de *S. pneumoniae*. Todas as séries mostraram resultados convergentes, em conformidade com os resultados esperados.











A reprodutibilidade intralote do teste NADAL® *S. pneumoniae* é de 100%.

#### 14. Referências

- 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 preventionof invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR, 59 (34) : 1102-1106, 2010.
- 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.
- 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. 0, 2018-06-26 MHNL

Symbol	Deutsch	English	Français	Español	Italiano	Polski
	CE Konformitätszeichen	CE marking of conformity	Conformité 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
	In-vitro-Diagnostika	In-vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositivo medico- diagnostico in vitro	Tylko do diagnostyki in vitro
	Temperaturbegrenzung	Temperature limitation	Limites de température	Límite de temperatura	Limiti di temperatura	Temperatura przechowywania
	Chargenbezeichnung	Batch code	Code du 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 européias	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 in vitro	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro	In vitro - diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite	Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik	In-vitro diagnostic medisinsk enhet
	Limites de temperatura	Teplotní omezení	Lämpötilarajat	Temperatur- begränsning	Temperatuurlimiet	Temperatur- begrænsning	Temperatur begrænsning
	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	Spotřebujte do	Käytettävä viimeistään	Används före	Houdbaar tot	Udløbsdato	Tidtaking
	Número de catálogo	Katalogov číslo	Luettelonumero	Listnummer	Catalogus nummer	Best il lingsnummer	Katalog nummer
	Fabricante	Výrobce	Valmistaja	Tilverkare	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

