

VERWENDUNGSZWECK

Die Antikörperreagenzien für direkte Fluoreszenzverfahren sind für die präsumptive (serologische) Identifizierung von *Legionella pneumophila* Serotyp 2 bis 14 aus Kulturisolaten bestimmt.^{1,2,5}

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Im Jahr 1976 war das US-amerikanische Center for Disease Control an einer eingehenden Untersuchung der Ursachen eines Ausbruches einer akuten fiebrigen Erkrankung in Philadelphia beteiligt. Die Erkrankung wurde später als Legionärskrankheit bezeichnet und es stellte sich heraus, dass sie von gramnegativen Stäbchen, den Legionellen, hervorgerufen wird.

Die Legionärskrankheit manifestiert sich in unterschiedlichen Formen, d.h. als asymptomatischer Infekt oder mit schwachen, grippeähnlichen Symptomen bis hin zu schwerer, in manchen Fällen sogar tödlicher Bronchialpneumonie.³

Legionellen können aus einer Vielzahl von klinischen Proben angezüchtet werden; zur Identifizierung von Legionellen in solchen Kulturen eignet sich der direkte Fluoreszenz-Antikörpertest (DFA-Test). Obgleich der DFA-Test sehr empfindlich und hoch spezifisch ist, sollte die Diagnose wenn möglich stets durch laborchemische Verfahren abgesichert werden.^{4,6,7}

TESTPRINZIP

Der direkte Immunfluoreszenz-Antikörpertest ist eines der schnellsten und einfachsten Immunfluoreszenzverfahren. Monoklonale Antikörper gegen Antigene von *Legionella* sind mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert, wodurch ein FITC-markiertes Antikörperreagenz gebildet wird.

Die zu testenden Isolate sind auf einem Objektträger fixiert und werden mit dem monoklonalen Antikörperreagenz überschichtet. Der FITC-markierte Antikörper bindet spezifisch an die im Isolat vorhandenen *Legionellen*-Antigene. Ist kein *Legionellen*-Antigen vorhanden, erfolgt keine Bindung des Antikörpers, der demzufolge später im Waschschritt entfernt wird.

Der FITC-markierte Antikörper-Antigen-Komplex wird nachgewiesen, indem der Objektträger in ultraviolettem oder blauviolett Licht betrachtet wird. Durch ultraviolettes oder blauviolett Licht wird das FITC zur Fluoreszenz im längeren (sichtbaren) Wellenlängenbereich angeregt, was als blaugrüne bzw. gelbgrüne Farbe erkennbar wird. *Legionellen* erscheinen unter diesen Bedingungen als leuchtend gelbgrüne Bazillen.

MITGELIEFERTE REAGENZIE UND MATERIALIEN

Legionella pneumophila, FITC-konjugiertes Kaninchen-Antiserum gegen einzelne Serotypen.


Kaninchen-Antiseren gegen Die FITC-markierten Antiseren werden gebrauchsfertig geliefert. Als Kontrastfärbung ist Rodaminisothiocyanat (ein Fluorochrom, das bei einer anderen Wellenlänge als FITC fluoresziert), konjugiert an normale Antikörper, in dem Reagenz vorhanden¹¹; 0,1% Natriumazid ist als Konservierungsmittel enthalten.

Es sind die folgenden FITC-Antikörperreagenzien (hergestellt in Kaninchen) erhältlich:

Katalog-Nr.		
PL.205 <i>Legionella</i> -DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 2		
PL.206 <i>Legionella</i> -DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 3		
PL.207 <i>Legionella</i> -DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 4		
PL.208 <i>Legionella</i> -DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 5		
PL.209 <i>Legionella</i> -DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 6		
PL.276 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 7		
PL.277 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 8		
PL.278 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 9		
PL.279 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 10		

PL.280 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 11		
PL.281 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 12		
PL.282 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz.	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 13		
PL.283 <i>L. pneumophila</i> DFA-Reagenz	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> Serotyp 14		

VORSICHTSHINWEISE

1. Reagenzien sind AUSSCHLIESSLICH FÜR DIE IN VITRO DIAGNOSTIK BESTIMMT.
2. Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr einsetzen.
3. Konjugat und Antigenreagenzien enthalten 0,1% Natriumazid.  Natriumazid kann bei Kontakt mit Kupfer oder Blei explosive Verbindungen bilden. Obwohl die Natriumazid-Konzentration im Reagenz minimal ist, sollte beim Entsorgen gebrauchter Reagenzienreste immer mit ausreichend Wasser nachgespült werden.
4. Patientenproben sind als potenziell infektiös anzusehen und es sind die bei mikrobiologischer Gefährdung angebrachten Vorsichtsmaßnahmen zu befolgen.
5. Die Objektträger sollten einzeln bearbeitet und eine Kreuzkontamination mit Färbereagenzien vermieden werden.
6. Das Färbereagenz darf während der Färbung auf keinen Fall auf dem Objektträger eintrocknen.
7. Die Auswertung sollte von Personen durchgeführt werden, die Erfahrung in der Fluoreszenzmikroskopie und bei der Durchführung von Antikörperverfahren mit direkter Fluoreszenz haben.
8. Alle in dieser Testanleitung enthaltenen Hinweise zur Testdurchführung und -aufbewahrung sowie zu Vorsichtsmaßnahmen und Verfahrensbeschränkungen müssen genau befolgt werden, um gültige Ergebnisse zu erzielen.

AUFBEWAHRUNG

FITC-Antikörperkonjugate:
Bei 2-8°C im Dunkeln aufbewahren. Das Konjugat ist bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum stabil. Nicht einfrieren.

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG

1. Probengewinnung und Anzucht
Geeignete klinischen Proben sollten unter Anwendung von medizinischen Standardverfahren gewonnen werden. Die Proben sollten nach der Gewinnung so schnell wie möglich angezüchtet werden, wobei Standardanzuchtverfahren für *Legionellen* zur Anwendung kommen (als Beispiel siehe Literaturquelle ⁶). Wachstum von *Legionellen* ist in der Regel erst nach mindestens 48 Stunden erkennbar und kann bis zu 10 Tage dauern, wenn das Isolat mit anderen Mikroorganismen kontaminiert ist und der Patienten Antibiotika erhalten hat.⁶

2. Herstellung von Kulturausstrichen:

DURCHFÜHRUNG IN BIOLOGISCHER SICHERHEITSKAMMER

- a. Eine dünne Suspension (McFarland Grad 1) mit Kolonien der mutmaßlichen *Legionellenkultur* in 1% neutralem Formalin herstellen.
- b. Ausstriche auf Doppelfeldobjektträgern oder auf Objektträgern mit mehreren Testfeldern herstellen. Pro Test sind jeweils drei Objektträger erforderlich.
- c. Lufttrocknen und vorsichtig erhitzen.
- d. Ausstrich in 10% neutralem Formalin 10 Minuten lang fixieren.
- e. Objektträger abklopfen, mit destilliertem Wasser abspülen und an der Luft trocknen.

3. Herstellung von Ausstrichen Zur Testung mit Kontrollantigen:

Bei jeder Testreihe von Kulturoisolate sollten Ausstriche zur Testung mit der polyvalenten Positivkontrolle (PL.285) mitgeführt werden. Die Ausstriche wie in Schritt 2 oben beschrieben herstellen.

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT GELIEFERTER MATERIALIEN

1. Positivkontrolle (von Pro-Lab in der Packungsgröße 1 ml erhältlich)
Kat-Nr. PL.285 (*L. pneumophila* Serotyp 1 bis 14)
2. Negativkontrolle (von Pro-Lab in der Packungsgröße 2 ml erhältlich)
Kat-Nr. PL.213A Kaninchen-Immunglobulin, konjugiert mit FITC.
3. Phosphatgepufferte Salzlösung (von Pro-Lab als Zehnfachkonzentrat der

- Packungsgröße 100 ml erhältlich)
Kat-Nr. PL.212
4. Eindeckmittel (von Pro-Lab in der Packungsgröße 10 ml erhältlich)
Kat-Nr. PL.213
 5. Eine Arbeitsbank zur Durchführung von Arbeiten mit Biogefährdung.
 6. Bunsenbrenner.
 7. Coplin-Küvette
 8. Saubere Objektträger für die Fluoreszenzmikroskopie.
 9. Deckgläschen.
 10. Immersionsöl.
 11. Gepuffertes Charcoal Yeast Extract Medium (BCYE-Medium).
 12. Inkubator (35°-37°C).
 13. Impföse.
 14. Feuchte Kammer.
 15. Steriles destilliertes Wasser.
 16. Sterile Petrischalen.
 17. Neutrales Formalin (10%).
 18. Fluoreszenzmikroskop (Transmission oder Auflicht).
Monokulares oder binokulares Fluoreszenzmikroskop mit 40x- und 100x- (Ölimmersions-) Objektiven und folgender Ausstattung (oder gleichwertiger Ausstattung):
Transmissionsbeleuchtung
- Kardoid-Dunkelfeldkondensator
- 200W Ultrahochdruck-Quecksilberlampe, 105W Hochdruck-Xenonlampe oder 100WTungsten-Halogenlampe.
- Wärmeabsorptionsfilter KG 1 oder B1/K2. Rotsuppressionsfilter BG38 oder BG23. Exciter-Filter KP 490 oder 2 x KP 490. Barrierefilter K 510 oder K 515.

Auflicht

- 50W, 100W oder 200W Ultrahochdruck-Quecksilberlampe, 75W oder 150W Hochdruck-Xenonlampe oder 50W oder 100W Tungsten-Halogenlampe.
- Wärmeabsorptionsfilter KG 1 oder B1/K2. Rotsuppressionsfilter BG38 oder BG23. Exciter-Filter KP 490 oder 2 x KP 490. TK 510 dichromischer Strahlteiler-Spiegel und K510 oder K 515 Barrierefilter.

Tungstenhalogenlampen eignen sich nicht immer für binokulare Mikroskope mit Transmissions- oder Auflicht.

TESTVERFAHREN

1. Das monovalente Konjugat auf den ersten Objektträger und die Negativkontrolle auf den zweiten Objektträger auftragen. Es sollte die gesamte Fläche des Objektträgers mit dem Ausstrich des Kulturisolates von dem Konjugatreagenz bedeckt sein.
2. Legen Sie die Objektträger in eine feuchte Kammer und inkubieren Sie sie 20 bis 30 Minuten lang bei 37°C.
3. Spülen Sie die Objektträger vorsichtig einzeln mit PBS ab, um das Konjugat zu entfernen.
4. Die Objektträger 5 Minuten lang in gesonderten Coplin-Küvetten mit PBS ein tauchen.
5. Die Objektträger mit destilliertem Wasser abspülen und an der Luft trocknen. Nach dem Trocknen müssen die Objektträger mit einem Deckglas eingedeckelt und sofort ausgewertet werden. Objektträger, die nicht sofort ausgewertet werden können, können bis zu 24 Stunden lang im Dunkeln aufbewahrt werden.
6. Geben Sie 4 bis 5 Tropfen Eindeckmittel auf den Objektträger und legen Sie ein Deckglas auf.
7. Die Objektträger sollten mit einem Fluoreszenzmikroskop unter schwacher Vergrößerung (etwa 40-fach) ausgewertet werden. Bei Vorhandensein fluo reszierender Bakterien sollte zur Bestätigung ein höher auflösendes Objektiv (Ölimmersionsobjektiv) eingesetzt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Test sollten sowohl die polyvalente Positivkontrolle als auch die Negativkontrolle mitgeführt werden. Es müssen alle im Abschnitt Auswertung der Ergebnisse, 1a, 1b und 1c, beschriebenen Kriterien erfüllt sein, damit ein Test als gültig eingestuft werden kann. Wenn diese Kriterien nicht erfüllt sind, sind die Testergebnisse zu verwerfen.



AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Legionellen sind pleomorph und eine Antibiotikatherapie kann zu einem verzögerten Auftreten von Anzuchtkolonien und zu Organismen mit uncharakteristischer Morphologie führen.

1. Damit ein Test gültig ist, müssen die folgenden Kriterien erfüllt sein.
 - a. Die Färbung muss mindestens von der Stärke 3+ sein und es muss die für ein Bazillum typische Morphologie vorliegen, damit ein Ergebnis als positiv gewertet werden kann.
 - 4+ = Zellwand ist leuchtend gelbgrün gefärbt.
 - 3+ = Zellwand ist leuchtend gelbgrün gefärbt.
 - 2+ = Schwache gelbgrüne Färbung. Zellwand nicht ausreichend definiert.
 - 1+ = diffuse, schwach gelbgrüne Färbung der Zelle.
 - b. Die im Test verwendeten monovalenten Konjugate produzieren bei der polyvalenten Positivkontrolle eine Färbung der Stufe 3+ bis 4+.
 - c. Die Negativkontrolle darf die Testproben nicht weisse anfarben.
2. Sind alle in Abschnitt 1 oben erwähnten Kriterien erfüllt, wird das Testergebnis wie folgt evaluiert.⁸
 - a. Hell fluoreszierende Bazillen (3+ oder stärker): FA-positiv für den entsprechenden Serotyp bzw. die entsprechende Art (siehe Punkt 3 und 4 unten).
 - b. Keine hell fluoreszierenden Bazillen: FA-negativ.
3. Ein positives Ergebnis mit einem monovalenten Konjugat zeigt an, dass der von diesem Konjugat erkannte Serotyp bzw. die erkannte Art im Isolat vorhanden ist.

VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN

1. Der DFA-Test ist präsumptiv für die Identifizierung von *Legionella pneumophila*, Serotyp 2 bis 14. Ein positives Testergebnis sollte durch Bestimmung von Wachstumsbedingungen und laborchemische Verfahren zum Nachweis von *Legionellen* bestätigt werden.
2. Ein negativer DFA-Test schließt das Vorhandensein von anderen *Legionellenarten* oder Serotypen außer den Getesteten in dem Isolat nicht aus.
3. Mischkulturen mit *Legionellen-Arten* oder -Serotypen, bei denen es sich nicht um die Getesteten handelt oder das Vorliegen einer sehr kleinen Anzahl von *Legionella pneumophila*, Serotyp 2 bis 14, können ebenfalls ein negatives Ergebnis produzieren. Die Verwendung von Isolaten, die aus Einzelkolonien hergestellt wurden, verringert die Wahrscheinlichkeit eines solchen Ergebnisses.
4. Bei manchen Stämmen von *Staphylokokken*, *Streptokokken*, *Flavobacterium*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Eikenella corrodens*, *Pseudomonas* einschließlich *P. fluorescens*, *P. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *P. putida* und bei anderen gramnegativen Stäbchen kann es aufgrund von natürlich im Serum von immunisierten Kaninchen vorkommenden Antikörpern oder aufgrund einer unspezifischen Bindung von Konjugat an Bestandteile der Zellwand zu unspezifischer Fluoreszenz kommen.¹² Eine unspezifische Fluoreszenz kann in der Regel anhand der Morphologie von einer spezifischen Reaktion mit *Legionellen* differenziert werden; Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der normalen Morphologie und der Färbetechnik sowie der Färbeeigenschaften von *Legionellen*.^{9,10}
5. Die direkte Verwendung dieser Reagenzien mit Patientenproben oder für Präparate, bei denen es sich nicht um Isolate klinischer Kulturen handelt, wurde nicht untersucht.

QUELLEN

1. **Cherry, W.B., B. Pittman, P.P. Harris, G.A. Herbert, B.M. Thomason, L. Thacker, R. Weaver.** 1978. Detection of Legionnaires' disease bacteria by direct immunofluorescent staining. *J. Clin. Microbiol.* 8: 329-338.
2. **McKinney, R.M.** 1980. Serological classification of *Legionella pneumophila* and detection of other *Legionella* by direct fluorescent antibody staining. *Clin. Immunol. Newsletter* 14: 1-3.
3. **Maynaud, C., E. Dournon.** Clinical features of Legionnaires' disease. In: A laboratory manual for *Legionella*. Harrison T.G., A.G. Taylor (Hrsg.). 1988. John Wiley and Sons. S.5-11.
4. **Harrison T.G., A.G. Taylor (Hrsg.).** 1988. A laboratory manual for *Legionella*. John Wiley and Sons. Anhang 1. S. 155-156.
5. **Reingold, A.L., B.M. Thomason, B.J. Brake, L. Thacker, H.W. Wilkinson, J.N. Kuritsky.** 1984. *Legionella* pneumonia in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness. *J. Infect. Dis.* 149: 819.
6. **E. Dournon.** Isolation of Legionellae from Clinical Specimens. In: A laboratory manual for *Legionella*. Harrison T.G., Taylor (Hrsg.). 1988. John Wiley and Sons. S.13-30.
7. **Edelstein, P.H.** 1987. Laboratory diagnosis of infections caused by Legionellae. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 4-9.
8. **Cherry, W.B., R.M. McKinney.** Detection of Legionnaires' disease bacteria in clinical specimens by direct immunofluorescence. In: Legionnaires' the disease, the bacterium and methodology. 1979. Jones, G.L. und G.A. Hebert (Hrsg.) USDHEW, PHS, CDC, Atlanta. S.92-103.
9. **Orrison, L.H., W.F. Bibb, W.B. Cherry, L. Thacker.** 1983. Determination of antigenic relationships among legionellae and non-legionellae by direct fluorescent antibody and immunodiffusion tests. *J. Clin. Microbiol.* 17: 332-337.
10. **Benson, R.F., W.L. Thacker, B.B. Plikaytis, H.W. Wilkinson.** 1987. Cross reactions in

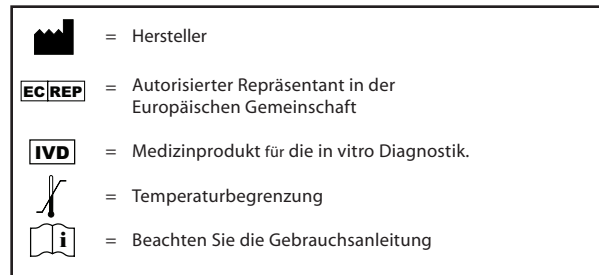
Legionella antisera with Bordetella pertussis strains. *J. Clin. Microbiol.* 25:594-596.

11. **Kawamura A. (Hrsg.)** 1969. Fluorescent antibody techniques and their application. Univ. of Tokyo Press. S. 72-73.
12. **Harrison T. G., A. G. Taylor.** Demonstration of Legionellae in Clinical Specimens. In: A laboratory manual for *Legionella*. Harrison T.G., A.G. Taylor (Hrsg.). 1988. John Wiley and Sons. S. 103-112.

Ebenfalls erhältlich von Pro-Lab:

PL.241 *Legionella pneumophila* Serotyp 1 DFA-Kit
[enthält *Legionella pneumophila* Serotyp 1 DFA-Reagenz (FITC-konjugierte, monoklonale Mausantikörper)] 50 Tests

PL.242 *Legionella pneumophila* Serotyp 1 bis 14 DFA-Kit
[enthält *Legionella pneumophila* Serotyp 1 bis 14 DFA-Reagenz (FITC-konjugierte, monoklonale Mausantikörper)] 50 Tests



Bei diesen Anleitungen handelt es sich um eine Fachübersetzung der englischen Originalversion. Bei Unklarheiten oder offensichtlichen Abweichungen wenden Sie sich bitte an Pro-Lab.