

USO PROPUESTO

Los reactivos de anticuerpo de fluorescencia directa están previstos para la identificación de presunción (serológica) de los serogrupos de 2 a 14 de *Legionella pneumophila* de aislados de cultivo^{1,2,5}.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Durante 1976 el Center for Disease Control participó en una investigación intensiva sobre la causa de un brote de una enfermedad febril aguda en Filadelfia. Se observó que la enfermedad, denominada posteriormente enfermedad de los legionarios, la había producido un bacilo gramnegativo denominado bacteria de la enfermedad de la *Legionella*.

Las manifestaciones de la enfermedad de los legionarios van desde la infección asintomática o los síntomas leves de tipo gripal a la bronconeumonía intensa, a veces mortal³.

La *Legionella* puede cultivarse de diversas muestras clínicas⁶ y puede usarse la prueba del anticuerpo de fluorescencia directa (AFD) para identificar la *Legionella* en tales cultivos. Aunque la prueba de AFD es sensible y muy específica, el diagnóstico debe confirmarse mediante caracterización bioquímica siempre que sea posible^{4,6,7}.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba con anticuerpo de fluorescencia directa es uno de los procedimientos de inmunofluorescencia más rápidos y más sencillos. Se conjugan anticuerpos dirigidos contra antígenos de *Legionella* con el fluorocromo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) para formar un reactivo con anticuerpo marcado con FITC.

Los aislados a estudiar se fijan a un portaobjetos de microscopio y se cubren con el reactivo de anticuerpo. El anticuerpo marcado con FITC se unirá específicamente a cualquier antígeno de *Legionella* presente en el aislado. Si no hay antígeno de *Legionella*, el reactivo de anticuerpo no se unirá y se eliminará en el paso de lavado.

El complejo anticuerpo marcado con FITC-antígeno se detecta exponiendo el portaobjetos a luz ultravioleta o azul violeta. La excitación por luz ultravioleta o azul violeta hace que el FITC tenga fluorescencia en las longitudes de onda más largas (visibles) produciendo un color azul/verde o amarillo/verde. Las células de *Legionella* aparecerán como bacilos amarillo-verde brillantes en estas condiciones.

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES

Antisueros de conejo conjugado con FITC frente a serogrupos individuales de *Legionella pneumophila*.

Se conjugan con FITC antisueros elaborados en conejos frente a cada uno de los serogrupos 2 a 14 de *L. pneumophila*. Los antisueros conjugados con FITC se suministran listos para usar. El isotiocianato de rodamina (un fluorocromo que tiene fluorescencia a una longitud de onda diferente de la de FITC) conjugados con suero de conejo normal está presente en el reactivo como contratinación¹¹ y se incluye azida sódica al 0,1% como conservante.

Se dispone de los siguientes reactivos de anticuerpo (de conejo) – FITC:

N.Cat.	
PL.205 Reactivo de AFD de <i>Legionella</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2	
PL.206 Reactivo de AFD de <i>Legionella</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 3	
PL.207 Reactivo de AFD de <i>Legionella</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 4	
PL.208 Reactivo de AFD de <i>Legionella</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 5	
PL.209 Reactivo de AFD de <i>Legionella</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 6	
PL.276 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 7	
PL.277 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 8	
PL.278 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 9	

PL.279 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 10	
PL.280 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 11	
PL.281 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 12	
PL.282 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 13	
PL.283 Reactivo de AFD de <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 14	

PRECAUCIONES

- Los reactivos son EXCLUSIVAMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN-VITRO.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del producto.
- Los reactivos de conjugado y antígeno contiene azida sódica al 0,1%. ⚠ La azida sódica puede reaccionar explosivamente con el plomo o el cobre, si se permite que se acumule. Aunque la cantidad de azida sódica en los reactivos es mínima, debe utilizarse una gran cantidad de agua cuando se eliminen los reactivos usados por el desague.
- Las muestras de los pacientes y los aislados de cultivos deben considerarse potencialmente infecciosos y deben seguirse precauciones adecuadas para los riesgos microbiológicos.
- Procese los portaobjetos individualmente y evite la contaminación cruzada con reactivos de tinción.
- No permita nunca que el reactivo de tinción se seque sobre el portaobjetos durante el procedimiento de tinción.
- La interpretación exige personal que tengan experiencia en microscopía de fluorescencia y procedimientos de anticuerpos de fluorescencia directa.
- Para obtener resultados válidos deben seguirse los procedimientos, condiciones de conservación, precauciones y limitaciones especificadas en estas instrucciones de uso.

CONSERVACIÓN

Reactivos de conjugado FITC-Anticuerpo: Conserve a +2-8°C en un lugar oscuro. El conjugado es estable hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta. No congelar.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Recogida y cultivo

Deben recogerse muestras clínicas adecuadas usando procedimientos médicos estándar. Las muestras deben cultivarse cuanto antes después de su recogida, usando procedimientos aceptados para la *Legionella* (por ejemplo, véase la referencia 9). La *Legionella* habitualmente precisará al menos 48 horas antes de que sea detectable el procedimiento y puede tardar hasta 10 días si el aislado está contaminado con otros microorganismos o el paciente ha recibido antibióticos⁶.

- Preparación de las extensiones de cultivos:

PROCESE EN VITRINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

- Haga una suspensión ligeramente turbia (McFarland N.° 1) de las colonias de cultivos sospechosas de ser *Legionella* en formol neutro al 1%.
- Prepare extensiones de portaobjetos de doble anillo o multipozo. Se necesitan tres conjuntos de portaobjetos para las pruebas.
- Seque al aire y caliente suavemente.
- Fije la extensión en formol neutro al 10% durante 10 minutos.
- Drene y enjuague con agua destilada y luego seque al aire los portaobjetos.

- Preparación de las extensiones de antígeno control:

Cada conjunto de aislados de cultivo estudiados debe incluir extensiones del antígeno control positivo polivalente (PL.285). Prepare las extensiones como se indica en 2 más arriba.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Antígeno control positivo (disponible de Pro-Lab en tamaño de 1 ml)
N. Cat. PL.285 (*L. pneumophila*, serogrupos 1 a 14)
- Antígeno control negativo (disponible de Pro-Lab en tamaño de 2 ml)
N. Cat. PL.213A Inmunoglobulina de conejo conjugada con FITC
- Solución salina con tampón fosfato (disponible de Pro-Lab como 100 ml de concentrado 10X)
N. Cat. PL.212
- Medio de montaje (disponible de Pro-Lab en tamaño de 10 ml)
N. Cat. PL.213
- Vitrina de seguridad biológica.
- Mechero Bunsen.
- Frascos de Coplin.
- Portaobjetos de microscopio limpios adecuados para microscopía de fluorescencia.
- Cubreobjetos.
- Acéite de inmersión.
- Medio de extracto de levadura con carbón vegetal, tamponado (BCYE)
- Incubador (35-37°C)
- Asa de inoculación.
- Cámara de humedad.
- Agua destilada estéril.
- Placas de Petri estériles.
- Formol neutro (10%)
- Microscopía de fluorescencia (luz transmitida o incidente).
Microscopio de fluorescencia monocular o binocular con objetivos de 40x y 100 x (inmersión en aceite) y el siguiente equipamiento (o equivalente):
Iluminación transmitida
 - condensador de campo oscuro cardioide
 - lámpara de mercurio de presión ultra-alta de 200W, lámpara de xenón de alta presión de 105W o lámpara halógena de tungsteno de 100 W.
 - Filtro de absorción de calor KG 1 o B1/K2. Filtro de supresión del rojo BG 38 o BG 23. Filtro excitador KP 490 o 2x KP 490. Filtro de barrera K 510 o K 515.

Iluminación incidente

- Lámpara de mercurio de presión ultra-alta 50W, 100W o 200W, lámpara de xenón de 75W o 150W de alta presión o lámpara de halógeno tungsteno de 50W o 100W.
- Filtro de absorción de calor KG 1 o B1/K2. Filtro de supresión del rojo BG 38 o BG 23. Filtro excitador KP 490 o 2 x KP 490. Espejo de división de haz dicrómico TK 510 y filtro de barrera K 510 o K 515.

Las lámparas de halógeno tungsteno pueden no usarse siempre satisfactoriamente con los microscopios binoculares para iluminación transmitida o incidente.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

- Aplique el conjugado monovalente al primer portaobjetos de tejido y el conjugado de control negativo al segundo portaobjetos. Toda la porción del portaobjetos que contiene la extensión del aislado de cultivo debe estar cubierta por el reactivo conjugado.
- Coloque los portaobjetos en una cámara de humedad e incube durante 20 a 30 minutos a 37°C.
- Enjuague suavemente los portaobjetos individualmente con PBS para eliminar los conjugados.
- Sumerja los portaobjetos durante 5 minutos en frascos de Coplin individuales con PBS.
- Enjuague con agua destilada y luego seque al aire los portaobjetos. Después del secado, los portaobjetos deben montarse y examinarse sin demora. Los portaobjetos que no pueden verse inmediatamente pueden conservarse en la oscuridad durante un máximo de 24 horas.
- Añada 4 a 5 gotas de medio de montaje al portaobjetos y aplique un cubreobjetos.
- Usando un microscopio de fluorescencia, examine los portaobjetos con un objetivo de poco aumento (aprox. 40x). Si se observan bacilos fluorescentes, examine bajo un objetivo de inmersión en aceite de gran aumento (100x) para confirmar.

CONTROL DE CALIDAD

Deben estudiarse con cada prueba un antígeno de control positivo polivalente y un conjugado control negativo. Deben cumplirse todos los criterios especificados en la Interpretación de los resultados secciones 1a, 1b y 1c, a continuación, para que una prueba sea válida. No comunique los resultados de la prueba si no se cumple cualquiera de estos criterios.



INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los bacilos de *Legionella* son pleomorfos y el tratamiento antibiótico puede conducir a la aparición diferida de colonias en cultivo y organismos con morfología no característica.

- Deben cumplirse los siguientes criterios para que una prueba sea válida.
 - La tinción DEBE ser al menos 3+ con morfología típica para un bacilo para que se puntúe como positiva.
 - 4+ = tinción de pared celular brillante amarillo-verde.
 - 4+ = tinción de pared celular brillante amarillo-verde.
 - 2+ = tinción amarillo verde apagada. Pared celular no bien definida.
 - 1+ = tinción amarillo verde difusa, pálida de la célula.
 - Los conjugados monovalentes empleados en la prueba deben producir una tinción 3+ a 4+ con el antígeno de control positivo polivalente.
 - El conjugado de control negativo no debe teñir las muestras de prueba.
- Si se cumplen todos los criterios en la sección 1 anterior, evalúe los resultados de la prueba como sigue⁸.
 - Bacilos con fluorescencia brillante (3+ o más fuerte): comuníquese como positivos para FA para los serogrupo(s) o especies correspondientes (véase 3 y 4 más abajo).
 - Sin bacilos con fluorescencia brillante: comuníquese como negativos para FA.
- Un resultado positivo con un conjugado monovalente indica que en el aislado está presente el serogrupo o la especie concreto especificado por ese conjugado.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La prueba de AFD es de presunción para la identificación de *Legionella pneumophila*, serogrupos 2 a 14. Un resultado positivo debe confirmarse mediante la valoración de los requisitos de crecimiento y las técnicas bioquímicas para las bacterias de *Legionella*.
- Una prueba AFD negativa no descarta la presencia de especies o serogrupos de *Legionella* distintos de aquellos para los que se ha estudiado el aislado.
- Los cultivos mixtos que contienen especies o serogrupos de *Legionella* distintos de aquellos para los que se ha estudiado el aislado junto con cantidades pequeñas de *Legionella pneumophila*, serogrupos 2 a 14 pueden dar también resultados negativos si la cantidad del último es muy pequeña. El uso de aislados obtenidos de colonias aisladas puede reducir la probabilidad de esta circunstancia.
- Puede producirse fluorescencia inespecífica con algunas cepas de *Staphylococci*, *Streptococci*, *Flavobacterium*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Eikenella corrodens*, *Pseudomonas incluidas P. fluoresces*, *P. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *P. putida* y otros bacilos gramnegativos, debido a los anticuerpos naturales en el suero de conejos inmunizados o debido a la unión inespecífica del conjugado a los componentes de la pared celular¹². La fluorescencia inespecífica normalmente puede distinguirse de la reacción específica con *Legionella* mediante características morfológicas si se está familiarizado con las características de morfología y tinción normales de los bacilos de *Legionella*^{9,10}.
- No se ha establecido el uso de estos reactivos directamente con muestras de pacientes o con preparaciones distintas de los aislados de cultivos clínicos.






BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Maynaud, C., E. Dournon.** Clinical features of Legionnaires' disease. In: A laboratory manual for *Legionella*. Harrison T.G., A.G. Taylor (eds). 1988. John Wiley and Sons. pp 5-11.
- Harrison, T.G., A.G. Taylor (eds.).** 1988. A laboratory manual for *Legionella*. John Wiley and Sons. Appendix 1. pp 155-156.
- 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.
- E. Dournon.** Isolation of Legionellae from Clinical Specimens. In: A laboratory manual for *Legionella*. Harrison T.G., Taylor (eds). 1988. John Wiley and Sons. pp 13-30.
- Edelstein, P.H.** 1987. Laboratory diagnosis of infections caused by *Legionellae*. *Eur J. Clin. Microbiol.* 6: 4-9.
- 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. and G.A. Hebert (eds.) USDHEW, PHS, CDC, Atlanta. pp.92-103.
- 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.
- 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.

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

Disponible también de Pro-Lab:

PL.241	Kit de AFD de <i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1 [Contiene reactivo de AFD de <i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1 (FITC-anticuerpos monoclonales de ratón)] 50 pruebas
PL.242	Kit de AFD de <i>Legionella pneumophila</i> serogrupos 1 a 14 [Contiene reactivo de AFD de <i>Legionella pneumophila</i> serogrupos 1 a 14 (FITC-anticuerpos monoclonales de ratón)] 50 pruebas

	= Fabricante
	= Representante Autorizado en la Comunidad Europea
	= Dispositivo para diagnóstico médico In vitro
	= Limite de temperatura
	= Consultar las instrucciones de uso

Las instrucciones de uso se tradujeron de manera profesional del inglés. En caso de ambigüedad o discrepancia evidente, por favor, dirijase al servicio de atención al cliente de Pro-Lab.