

DOMAINE D'APPLICATION

Les réactifs d'immunofluorescence directe sont réservés à l'identification à présomption (sérologique) du germe *Legionella pneumophila*, sérogroupes 2 à 14, sur des isolats de culture ^{1,2,5}.

RESUME ET EXPLICATION

Au cours de 1976, le Centre épidémiologique a participé à une recherche intensive de la cause d'une flambée de maladie fébrile aiguë en Philadelphie. Par la suite, le bacille en bâtonnet Gram négatif que l'on a découvert être à l'origine de cette affection, dénommée par la suite maladie des légionnaires, a été appelé bactérie de la maladie à *Legionella*.

Les manifestations de la maladie des légionnaires vont de l'infection asymptomatique, ou des symptômes peu graves semblables à la grippe à des bronchopneumonies graves et souvent fatales.³

Le *Legionella* peut être cultivé à partir d'une variété d'échantillons cliniques ⁶ et le test d'immunofluorescence directe (IFD) est utilisé pour identifier le *Legionella* dans ces cultures. Bien que le test IFD soit sensible et hautement spécifique, le diagnostic doit être confirmé par la caractérisation biochimique dans la mesure du possible^{4,6,7}.

PRINCIPE DU TEST

Le test d'immunofluorescence directe est l'un des protocoles d'immunofluorescence les plus rapides et les plus simples. Des anticorps dirigés contre les antigènes de *Legionella* sont conjugués au fluorochrome, l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) pour former un réactif aux anticorps marqué à l'ITCF.

Les isolats à tester sont fixés sur une lame de microscope et appliqués avec le réactif d'anticorps. L'anticorps marqué à l'ITCF se liera spécifiquement à n'importe quel antigène de *Legionella* présent dans l'isolat. A défaut d'antigènes de *Legionella*, le réactif aux anticorps ne se lie pas et il est éliminé lors de la phase de lavage.

Le complexe antigène-anticorps marqué à l'ITCF est détecté en exposant la lame aux rayons ultraviolets ou violets bleus. L'excitation aux rayons ultraviolets ou violets bleus cause la fluorescence de l'ITCF dans les longueurs d'onde les plus longues (visibles) tout en produisant une couleur bleue/verte ou jaune/verte. Dans ces conditions, les cellules de *Legionella* apparaissent sous forme de bacilles jaunes-verts brillants.

REACTIFS ET MATERIEL DISPONIBLE

Legionella pneumophila, antisérums de lapin conjugué marqués à l'ITCF, séro groupe simple.


Les antisérums préparés sur des lapins contre chacun des sérogroupes de 2 à 14 de *L. pneumophila* sont conjugués avec l'ITCF. Les antisérums conjugués à l'ITCF sont fournis prêts à l'emploi. L'isothiocyanate de rhodamine (un fluorochrome fluorescent à une longueur d'onde différente de celle de l'ITCF) conjugué à du sérum de lapin normal est présent dans le réactif, en tant que coloration de contraste¹¹ et de l'azide de sodium à raison de 0,1 % est inclus comme agent de conservation.

Les réactifs d'anticorps (lapin) marqués à l'ITCF suivants sont disponibles :

Cat.#		
PL.205 Réactif IFD <i>Legionella</i> .	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 2		
PL.206 Réactif IFD <i>Legionella</i> .	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 3		
PL.207 Réactif IFD <i>Legionella</i> .	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 4		
PL.208 Réactif IFD <i>Legionella</i> .	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 5		
PL.209 Réactif IFD <i>Legionella</i> .	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 6		
PL.276 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i> .	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 7		
PL.277 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i>	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 8		
PL.278 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i>	0,5 ml	
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 9		

PL.279 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i>	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 10	
PL.280 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i>	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 11	
PL.281 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i>	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 12	
PL.282 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i>	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 13	
PL.283 Réactif IFD <i>L. pneumophila</i>	0,5 ml
<i>L. pneumophila</i> , séro groupe 14	

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs sont réservés à l'USAGE DIAGNOSTIC IN VITRO.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption imprimée sur l'étiquette du produit.
- Le conjugué et les réactifs d'antigène contiennent de l'azide  de sodium à raison de 0,1 % . L'accumulation d'azide de sodium dans les tuyauteries en cuivre ou en plomb peut provoquer une réaction explosive. En dépit de la quantité d'azide de sodium minimale que contiennent les réactifs, rincer abondamment à l'eau lors de l'élimination dans les tuyauteries.
- Prendre toutes les précautions de sécurité qui s'imposent pour manipuler, traiter et éliminer tous les échantillons de patient et les isolats de culture potentiellement infectieux.
- Traiter les lames individuellement et éviter toute contamination croisée avec les réactifs de coloration.
- Ne jamais laisser sécher les réactifs de coloration sur la lame pendant la procédure de coloration.
- L'interprétation exige un personnel expérimenté dans la microscopie à fluorescence sachant effectuer les procédures d'immunofluorescence directe.
- Les procédures, les conditions de conservation, les précautions d'emploi et les limites d'utilisation spécifiées dans cette notice doivent être respectées pour assurer la validité des tests réalisés.

CONSERVATION

Réactif de conjugué-anticorps marqués à l'ITCF :
 Conserver entre 2° et 8°C à l'abri de la lumière. Le conjugué est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit. Ne pas congeler.

PREPARATION DES ECHANTILLONS ET MISE EN CULTURE

- Prélèvement et mise en culture :

Prélever les échantillons cliniques pertinents selon les protocoles médicaux standard. Les échantillons doivent être repiqués aussitôt que possible après le prélèvement selon les procédures validées pour *Legionella* (pour un exemple, voir référence ⁹). Le germe *Legionella* exige normalement un délai de 48 heures minimum pour pouvoir détecter la prolifération et peut prendre jusqu'à 10 jours si l'isolat est contaminé par d'autres micro-organismes ou si le patient a reçu des antibiotiques⁵.

- Préparation des frottis de culture :
 PROCESSUS DANS L'ENCEINTE DE BIOSECURITE

- Effectuer une mise en suspension légèrement trouble (Mcfarland No.1) de colonies de cultures susceptibles d'être du germe *Legionella* dans 1 % de formol neutre.
- Préparer des frottis sur double cercle ou sur une lame à multi-cupules. Trois ensembles sont requis pour le test.
- Sécher à l'air et chauffer doucement.
- Fixer le frottis dans 10 % de formol neutre pendant 10 minutes.
- Drainer et rincer à l'eau distillée, puis sécher les lames à l'air.

- Préparation des frottis d'antigène témoin:
 Chaque ensemble d'isolats de culture testés doit inclure des frottis de l'antigène témoin positif polyvalent (PL.285). Préparer les frottis comme décrit au point 2.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Antigène témoin positif (disponible de Pro-Lab en dose de 1 ml)
 Cat # PL.285 (*L. pneumophila*, sérogroupes 1 à 14)
- Antigène témoin négatif (disponible de Pro-Lab en doses de 2 ml)
 Cat # PL.213A conjugué d'immunoglobuline de lapin et d'ITCF
- Soluté tamponné au phosphate (disponible chez Pro-Lab en doses de 100 ml de concentré 10X)
 Cat # PL.212
- Milieu de montage (disponible chez Pro-Lab en doses de 10 ml)
 Cat # PL.213
- Enceinte de biosécurité.
- Bec Bunsen.
- Jarres de Coplin.
- Lames pour microscope propres qui conviennent à la microscopie à fluorescence.
- Lamelles.
- Huile d'immersion.
- Milieu à l'extrait de levure et au charbon, tamponné (MCETCL).
- Incubateur (35°-37°C).
- Anse d'ensemencement.
- Chambre humide.
- Eau distillée stérile.
- Boîtes de Petri stériles.
- Formol neutre (10%)
- Microscope à fluorescence (lumière transmise ou incidente).
 Microscope à fluorescence équipé d'objectifs 40x et 100x (immersion dans l'huile) et du matériel suivant (ou équivalent) :
 Lumière transmise
 - condensateur cardioïde
 - lampe à vapeur de mercure, pression ultra-élevée, 200W, lampe au xénon haute pression, 105W ou lampe halogène au tungstène, 100W lampe halogène au tungstène.
 - Filtre anticalorique KG 1 ou B1/K2. Filtre de suppression rouge BG 38 ou BG 23. KP 490 1 ou deux filtres d'excitation KP 490. Filtre-barrière K 510 ou K 515.
 Eclairage incident
 - Lampe au mercure pression ultra-élevée 50W, 100W ou 200W, lampe au xénon haute pression 75W ou 150W ou lampe halogène au tungstène 50W ou 100W lampe xénon, ou lampe halogène au tungstène 50W ou 100W.
 - Filtre anticalorique KG 1 ou B1/K2. Filtre de suppression rouge BG 38 ou BG 23. KP 490 1 ou deux filtres d'excitation KP 490. Miroir de séparation à faisceau dichroïque TK 510 et filtre à barrière K 510 ou K 515

Il n'est pas toujours possible d'utiliser les lampes halogènes au tungstène avec des microscopes binoculaires pour un éclairage transmis ou incident.

PROTOCOLE DU TEST

- Appliquer du conjugué monovalent à la lame du premier tissu et le conjugué témoin négatif à la deuxième lame. Toute la partie de la lame contenant le frottis de l'isolat de culture doit être recouverte de réactif de conjugué.
- Placer les lames dans une chambre humide et incubé pendant une période allant de 20 à 30 minutes à 37°C.
- Rincer délicatement les lames, une par une avec le STP pour éliminer les conjugués.
- Immerger les lames pendant 5 minutes dans des jarres de Coplin individuelles contenant du STP.
- Rincer les lames à l'eau distillée et sécher à l'air. Après séchage, monter les lames et les examiner sans tarder. Les lames qu'il est impossible d'examiner immédiatement peuvent être conservées à l'obscurité pendant 24 heures au maximum.
- Ajouter 4 à 5 gouttes de milieu de montage à la lame et la recouvrir d'une lamelle.
- A l'aide d'un microscope à fluorescence, examiner les lames à fluorescence avec un objectif faible puissance (environ -40x). Si des bacilles fluorescents sont observés, examiner avec un objectif haute puissance (100x), et immersion d'huile, pour obtenir une confirmation.

CONTROLE DE QUALITE

Exécuter les antigènes témoin positif polyvalent et le conjugué de témoin négatif avec chaque test. Tous les critères spécifiés dans l'Interprétation des Résultats, sections 1a, 1b et 1c ci-dessous, doivent être satisfaits pour qu'un test soit valable. Ne pas indiquer les résultats du test si aucun de ces critères n'est satisfait.



INTERPRETATION DES RESULTATS

Comme les bacilles de *Legionella* sont pléomorphiques, une antibiothérapie peut retarder l'apparition des colonies dans une culture et des organismes à morphologie atypique.

- Les critères suivants doivent être satisfaits pour qu'un test soit valable.
 - La coloration DOIT être au moins 3+ avec la morphologie type d'un bacille, pour que le résultat soit positif.
 - 4+ = coloration de la paroi cellulaire jaune-vert brillant.
 - 3+ = coloration de la paroi cellulaire jaune-vert vif.
 - 2+ = coloration jaune-vert terne. Paroi cellulaire mal définie.
 - 1+ = diffusée, coloration jaune-verte faible de la cellule.
 - Les conjugués monovalents utilisés dans le test doivent produire une coloration entre 3+ et 4+ avec l'antigène témoin positif polyvalent.
 - Le conjugué témoin négatif ne doit pas tâcher les échantillons de test.
- Si tous les critères de la section 1 ci-dessus sont satisfaits, évaluer les résultats du test comme suit⁹.
 - Bacilles fluorescents lumineux (3+ ou plus fort) : rapporter le résultats considéré comme AIF positif pour le ou les sérogroupes ou les espèces appropriés (voir 3 et 4 ci-dessous).
 - Pas de bacilles fluorescents lumineux : rapporter le résultat comme AIF-négatif.
- Un résultat positif avec un conjugué monovalent indique que le séro groupe ou l'espèce spécifiée(e) par ce conjugué se trouve dans l'isolat.

LIMITES

- Le test d'IFD est à présomption pour l'identification du germe *Legionella pneumophila*, sérogroupes 2 à 14. Un résultat positif doit être confirmé par l'évaluation des conditions requises de prolifération et des techniques biochimiques pour les bactéries du genre *Legionella*.
- Un test d'IFD négatif n'exclut pas la présence d'espèces de *Legionella* autres que celles pour lesquelles l'isolat a été testé.
- Les cultures mixtes contenant des espèces ou des sérogroupes de *Legionella* avec un faible nombre de *Legionella pneumophila*, sérogroupes 2 à 14, peuvent également donner des résultats négatifs si la quantité est très faible. L'utilisation d'isolats dérivés des colonies simples peut réduire la susceptibilité de cette survenue.
- Une fluorescence non spécifique peut se produire avec certaines souches de staphylocoques, streptocoques, flavobactéries, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Eikenella corodens*, *Pseudomonas* tels que *P. fluoresces*, *P. maltophilia*, *P. aeruginosa* *P. putida* et d'autres bacilles en bâtonnets Gram négatif, en raison des anticorps naturels dans le sérum des lapins immunisés ou des liaisons non spécifiques des conjugués aux composants de la paroi cellulaire¹². Une fluorescence non spécifique peut être normalement distinguée de la réaction spécifique avec le *Legionella* au niveau morphologique à condition de bien connaître la morphologie normale et les caractéristiques de coloration des bacilles de *Legionella*^{9,10}.
- L'utilisation directe de ces réactifs sur les échantillons du patient ou pour des préparations autres que les isolats de culture cliniques n'a pas été définie.

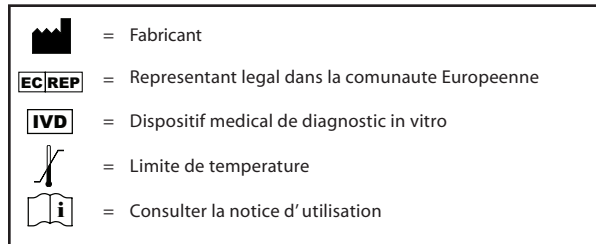
BIBLIOGRAPHIE

- 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.

Egalement disponible chez Pro-Lab:

- | | |
|--------|---|
| PL.241 | 1 kit AIFD <i>Legionella pneumophila</i> , séro groupe 1 DFA Kit
[Contient 1 réagent AIFD d <i>Legionella pneumophila</i> , séro groupe 1 (anti corps monoclonaux de souris ITCF)] 50 tests |
| PL.242 | Kit AIFD <i>Legionella pneumophila</i> , sérogroupes 1 à 14
[Contains <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 to 14 DFA Reagent (FITC-
[Contient le réactif AIFD au <i>Legionella pneumophila</i> , séro groupe 1 to 14
(anticorps monoclonaux de souris ITCF)] 50 tests |



Ce mode d'emploi est une traduction professionnelle de la version anglaise d'origine. En cas d'ambiguïté ou de divergence flagrante, veuillez consulter le Service de soutien de Pro-Lab.