

**IMPIEGO PREVISTO**

I reagenti per anticorpi a fluorescenza diretta sono impiegati per l'identificazione sierologica presuntiva di colonie isolate di *Legionella pneumophila* dei sierogruppi da 2 a 14<sup>1,2,5</sup>.

**INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST**

Nel 1976 il Centro per la Lotta contro le Malattie (Center for Disease Control) prese parte ad un'impegnativa indagine riguardante la causa di uno scoppio di una malattia con febbre acuta a Filadelfia. Tale condizione, poi definita Malattia dei Legionari, risultò causata da un bastoncello gram-negativo denominato Batterio della *Legionella*.

Le manifestazioni della malattia dei Legionari variano da infezione asintomatica o lievi sintomi di tipo influenzale a broncopolmonite severa, talvolta con esito infausto<sup>3</sup>.

La *Legionella* può essere isolata da un'ampia varietà di campioni clinici<sup>6</sup> e il DFA (Direct Fluorescent Antibody test) è il metodo d'elezione per l'identificazione di *Legionella* in questi campioni. Pur essendo sensibile e altamente specifico, il test DFA deve essere affiancato, quando possibile, da una caratterizzazione biochimica<sup>4, 6, 7</sup>.

**PRINCIPIO DEL METODO**

Il test per anticorpi a fluorescenza diretta rappresenta una delle procedure ad immuno-fluorescenza più veloci e più semplici. Gli anticorpi diretti contro gli antigeni di *Legionella* sono coniugati al fluorocromo, isotiocianato di fluorescina (FITC), per formare un anticorpo marcato con FITC.

I ceppi da testare sono fissati su di un vetrino per microscopia e ricoperti con il reagente contenente l'anticorpo. L'anticorpo marcato FITC si lega in modo specifico a qualsiasi antigene di *Legionella* presente nel ceppo. In assenza dell'antigene di *Legionella*, il reagente dell'anticorpo non forma alcun legame ed è eliminato nella fase di lavaggio.

Il complesso che si forma tra anticorpo-FITC marcato e l'antigene è rilevato mediante esposizione del vetrino ai raggi UV o alla luce blu-violetta. L'eccitazione degli elettroni generata da questi tipi di luce comporta l'emissione di fluorescenza da parte del FITC nel visibile, con luce di colore blu/verde o giallo/verde. In queste condizioni, le cellule di *Legionella* appaiono come bacilli di color giallo/verde brillante.

**REAGENTI E MATERIALI DISPONIBILI**


*Legionella pneumophila*, antisieri coniugati con FITC di coniglio di singolo sierogruppo. Gli antisieri prodotti nel coniglio diretti contro la *Legionella pneumophila*, sierogruppi da 2 a 14, sono coniugati con FITC. Gli antisieri coniugati con FITC sono pronti per l'uso. La rodamina isotiocianato (un fluorocromo fluorescente ad una lunghezza d'onda diversa da quella del FITC) coniugata al normale siero di coniglio è presente nel reagente come colorante di contrasto<sup>11</sup>, mentre come conservante è stata utilizzata sodio azide 0,1%.

Sono disponibili i reagenti con anticorpo FITC (di coniglio) indicati di seguito:

Cat. N.		
PL.205	Reagente <i>Legionella</i> DFA. <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 2	0,5 ml
PL.206	Reagente <i>Legionella</i> DFA. <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 3	0,5 ml
PL.207	Reagente <i>Legionella</i> DFA. <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 4	0,5 ml
PL.208	Reagente <i>Legionella</i> DFA. <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 5	0,5 ml
PL.209	Reagente <i>Legionella</i> DFA. <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 6	0,5 ml
PL.276	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> . <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 7	0,5 ml
PL.277	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 8	0,5 ml
PL.278	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 9	0,5 ml
PL.279	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 10	0,5 ml
PL.280	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 11	0,5 ml

PL.281	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 12	0,5 ml
PL.282	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 13	0,5 ml
PL.283	Reagente DFA <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 14	0,5 ml

**AVVERTENZE**

1. I reagenti sono destinati ESCLUSIVAMENTE AD USO DIAGNOSTICO IN VITRO.
2. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulla confezione.
3. I reagenti per coniugato ed antigene contengono sodio azide 0,1%.  Il composto può reagire in modo esplosivo con rame o piombo se lasciato accumulare. Benché la quantità di sodio azide nei reagenti sia minima, è necessario utilizzare una grande quantità di acqua quando si scaricano nel lavandino i reagenti utilizzati.
4. I campioni clinici e le colture isolate devono essere considerati potenzialmente infettivi e pertanto si dovranno osservare le precauzioni adeguate per i materiali con un potenziale rischio microbiologico.
5. Trattare i vetrini singolarmente ed evitare una contaminazione crociata con i coloranti.
6. Non lasciare che i coloranti si asciughino sul vetrino durante la procedura di colorazione.
7. L'interpretazione richiede personale con esperienza in microscopia a fluorescenza nelle procedure anticorpali a fluorescenza diretta.
8. Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.

**CONSERVAZIONE**

Reagenti coniugati con anticorpo FITC:

Conservare a 2°-8°C al buio. Il coniugato è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.

**CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

1. Campionamento e coltura:

Raccogliere campioni clinici adeguati, avvalendosi delle procedure mediche standard. Effettuare la coltura dei campioni appena possibile dopo il prelievo, utilizzando procedure accettate per la *Legionella* (per esempio ved. riferimento<sup>6</sup>). La *Legionella* richiede generalmente almeno 48 ore prima che sia visibile la crescita e può impiegare 10 giorni se il ceppo è contaminato da altri organismi o il paziente è stato trattato con antibiotici<sup>6</sup>.

2. Preparazione dello striscio culturale:

TRATTARE IL CAMPIONE SOTTO UNA CAPPA DI SICUREZZA BIOLOGICA.

- a. Preparare una sospensione leggermente torbida (McFarland 1) in 1% di formalina neutra di colonie prelevate da una coltura sospettata appartenere al genere *Legionella*.
- b. Preparare gli strisci su un doppio anello o su un vetrino multi-pozzetti. Per l'ese cuzione dei test sono necessari tre set di vetrini.
- c. Lasciare asciugare e scaldare delicatamente.
- d. Fissare lo striscio in formalina neutra al 10% per 10 minuti.
- e. Scolare e sciacquare con acqua distillata, quindi lasciare asciugare.

3. Preparare lo striscio per l'antigene di controllo:

Ogni gruppo di ceppi testati deve includere strisci dell'antigene per il Controllo Positivo Polivalente (PL.285). Preparare lo striscio come al punto 2 precedente.

**MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO**

1. Antigene per il Controllo Positivo (disponibile presso Pro-Lab in misure da 1 ml)  
Cat N. PL.285 (*L. pneumophila* sierogruppi da 1 a 14)
2. Reagente di Controllo Negativo (disponibile presso Pro-Lab in misure da 2 ml)  
Cat N. PL.213A FITC coniugata con immunoglobulina di coniglio
3. Soluzione salina tamponata con fosfato (disponibile presso Pro-Lab in forma di concentrato da 100 ml, 10X)  
Cat N. PL.212

4. Mounting Media (disponibile presso Pro-Lab in misure da 10 ml)  
Cat N. PL.213

5. Cappa di sicurezza biologica.
6. Becco Bunsen.
7. Vaschette Coplin.
8. Vetrini puliti per microscopia a fluorescenza.
9. Coprivetrini.
10. Olio da immersione.
11. Terreno tamponato al carbone con estratto di lieviti (BCYE).
12. Incubatore (35°-37°C).
13. Anse da microbiologia.
14. Camera umida.
15. Acqua distillata sterile.
16. Piastre Petri sterili.
17. Formalina neutra (10%).
18. Microscopio a fluorescenza (luce incidente o trasmessa).  
Microscopio a fluorescenza monoculare o binoculare con obiettivi da 40x e 100x (immersione in olio) e la seguente attrezzatura (o equivalente):  
Illuminazione trasmessa:
  - condensatore per campo oscuro a cardioide
  - lampada al mercurio a pressione ultra-alta da 200W; lampada allo xenon ad alta pressione da 105W o lampada alogena al tungsteno da 100W.
  - filtro ad assorbimento del calore KG1 o B1/K2; filtro di soppressione del rosso BG 38 o BG 23; filtro di eccitazione 2 x KP 490; filtro barriera K 510 o K 515.

Illuminazione incidente:

- lampada al mercurio a pressione ultra-alta da 50W, 100W o 200W, lampada allo xenon ad alta pressione da 75W o 150W, o lampada alogena al tungsteno da 50W o 100W.
- filtro ad assorbimento del calore KG1 o B1/K2; filtro di soppressione del rosso BG 38 o BG 23; filtro di eccitazione KP 490 o 2 x KP 490; beam splitting mirror dicroico TK 510 e filtro barriera K 510 o K 515.

Non sempre le lampade alogene al tungsteno possono essere utilizzate in modo proficuo con i microscopi binoculari sia per la luce trasmessa che per quella incidente.

**PROTOCOLLO DEL TEST**

1. Applicare un coniugato monovalente al primo vetrino di tessuto ed un coniugato del Controllo Negativo al secondo vetrino. L'intera porzione del vetrino con la strisciatura del ceppo della coltura deve essere coperta dal reagente coniugato.
2. Posizionare i vetrini in una camera umida e incubare per 20-30 minuti a 37°C.
3. Sciacquare delicatamente uno ad uno i vetrini con PBS per rimuovere il coniugato.
4. Immergere i vetrini per 5 minuti in singole vaschette coplin contenenti PBS.
5. Sciacquare i vetrini con acqua distillata e lasciare asciugare. Una volta asciutti, i vetrini devono essere montati e esaminati immediatamente. I vetrini, non valutati immediatamente, possono essere mantenuti al buio per un massimo di 24 ore.
6. Aggiungere da 4 a 5 gocce di "mounting medium" sul vetrino e applicare il coprivetrino.
7. Con un microscopio a fluorescenza esaminare i vetrini sotto un obiettivo a bassa potenza (circa - 40x). Se vengono rilevati bacilli fluorescenti, esaminare con un obiettivo ad alta potenza (100x) con immersione in olio.

**CONTROLLO DI QUALITÀ**

Accompagnare ogni test con l'analisi sia dell'antigene del Controllo Positivo polivalente che del coniugato del Controllo Negativo. Devono essere soddisfatti tutti i criteri specificati nella sezione Interpretazione dei risultati (1a, 1b e 1c) perché il test sia valido. Non riportare i risultati del test se non si riscontrano questi criteri.

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

I bacilli della *Legionella* sono pleomorfici e la terapia antibiotica può determinare una comparsa ritardata delle colonie in coltura e degli organismi senza una morfologia caratteristica.

1. Affinché il test sia valido, devono essere rispettati i seguenti criteri:
  - a. la colorazione DEVE essere almeno di 3+ con la tipica morfologia di un bacillo per ché possa essere considerata positiva.



- 4+ = colorazione parete cellulare giallo/verde brillante.
- 3+ = colorazione parete cellulare giallo/verde luminoso.
- 2+ = colorazione di giallo/verde spento. Parete cellulare non ben definita.
- 1+ = colorazione cellulare giallo/verde diffuso e fioco.

- b. il coniugato monovalente utilizzato durante il test deve dare da 3+ a 4+ con il Controllo Positivo polivalente.
  - c. il coniugato del controllo negativo non deve colorare i campioni da testare.
2. Se si riscontrano tutti i criteri menzionati nella sezione 1 di cui sopra, valutare i risultati del test come segue 8.
- a. Bacilli intensamente fluorescenti (3+ o più forte): riportare come FA positivo per il/i sierogruppo/i o la/e specie appropriata/i (ved. 3 e 4 riportati di seguito).
  - b. Assenza di bacilli intensamente fluorescenti: riportare come FA negativo.
3. Un risultato positivo con un coniugato monovalente indica che il sierogruppo o la specie indicato/a dal coniugato è presente nel ceppo isolato.

#### LIMITI DEL METODO

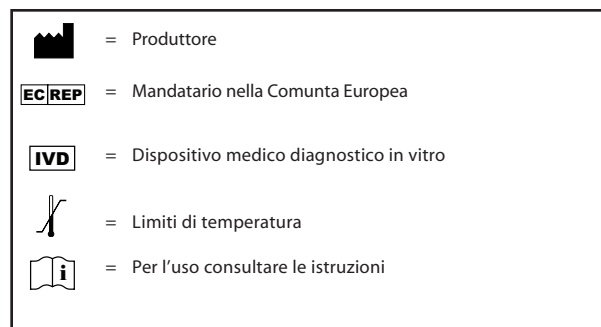
1. Il test DFA è di tipo presuntivo per l'identificazione della *Legionella pneumophila*, sierogruppi da 2 a 14. Un risultato positivo deve essere confermato da una valutazione dei requisiti della crescita e dalle tecniche biochimiche per i batteri *Legionella*.
2. Un test DFA negativo non preclude la presenza di specie e sierogruppi di *Legionella* diversi da quelli per cui il ceppo è stato analizzato.
3. Anche colture miste contenenti specie o sierogruppi di *Legionella* diversi da quelli per cui il ceppo è stato testato, insieme a numeri ridotti di *Legionella pneumophila*, sierogruppi da 2 a 14, possono dare risultati negativi se la quantità di questi ultimi è molto bassa. L'utilizzo di ceppi ottenuti da singole colonie può ridurre la probabilità di questa evenienza.
4. Una fluorescenza non specifica può verificarsi con alcuni ceppi di *Stafilococchi*, *Streptococchi*, *Flavobacterium*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Eikkenella corodens*, *Pseudomonas including P. fluoresces*, *P. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *P. putida* ed altri bastoncelli gram-negativi, a causa degli anticorpi naturali presenti nel siero di conigli immunizzati o a legame non specifico del coniugato con componenti della parete cellulare<sup>12</sup>. La fluorescenza non specifica è solitamente distinguibile dalla reazione specifica con la *Legionella* per ragioni morfologiche, purché si conoscano bene la normale morfologia ed anche le caratteristiche della colorazione dei bacilli della *Legionella*<sup>9,10</sup>.
5. Non è stato verificato l'utilizzo di questi reagenti direttamente su campioni prelevati da pazienti o per preparazioni diverse dai ceppi isolati in coltura.

#### BIBLIOGRAFIA

1. **Cherry, W.B., B. Pittman, P.P. Harris, G.A. Herbert, B.M. Thomason, L. Thacker, R. 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. 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 (eds.). 1988. John Wiley and Sons. pp 5-11.
4. **Harrison, T.G., A.G. Taylor (eds.).** 1988. A laboratory manual for *Legionella*. John Wiley and Sons. Appendix 1. pp 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 (eds.). 1988. John Wiley and Sons. Pp 3-30
7. **Edelstein, P.H.** 1987. 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 by direct immunofluorescent 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.
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. (ed.)** 1969. Fluorescent antibody techniques and their application. Univ. of Tokyo Press. pp 72-73.
12. **Harrison T.G., 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 3-112

Reperibili sempre presso Pro-Lab:

- PL.241 Kit DFA *Legionella pneumophila* sierogruppo 1  
[Contiene Reagente DFA *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 (anticorpi monoclonali di topo marcati con FITC)] 50 test
- PL.242 Kit DFA *Legionella pneumophila* sierogruppo da 1 a 14  
[Contiene Reagente DFA *Legionella pneumophila* sierogruppo da 1 a 14 (anticorpi monoclonali di topo marcati con FITC)] 50 test



**Le presenti istruzioni per l'uso sono state accuratamente tradotte dalla versione originale in lingua inglese. In caso di ambiguità o apparente discrepanza rivolgersi al servizio assistenza Pro-Lab.**