

BEOOGD GEBRUIK

De Directe fluorescentie-antilichaamreagentia zijn bedoeld voor de presumptieve (serologische) identificatie van *Legionella pneumophila* serogroepen 2 tot en met 14 uit kweekisolaten ^{1,2,5}.

SAMENVATTING EN VERKLARING

Gedurende 1976 was het Center for Disease Control betrokken bij een intensief onderzoek naar de oorzaak van een uitbarsting van acute febrile ziekte in Philadelphia. De conditie, die vervolgens Veteranenziekte werd genoemd, bleek te zijn veroorzaakt door een Gram-negatief staafje die *Legionella* Disease Bacterium werd genoemd.

De manifestaties van de Veteranenziekte variëren van asymptomatische infectie of milde influenza-achtige symptomen tot ernstige, soms fatale, bronchopneumonia ³.

Legionella kan worden gekweekt vanuit een verscheidenheid aan klinische monsters ⁶ en de Directe fluorescentie-antilichaam- (DFA) test gebruikt voor het identificeren van *Legionella* in dergelijke kweken. Hoewel de DFA-test gevoelig en uitermate specifiek is, dient de diagnose waar mogelijk bevestigd te worden door middel van biochemische karakterisering ^{4,6,7}.

PRINCIPE VAN DE TEST

De directe fluorescentie-antilichaamtest is één van de snelste en simpelste immunofluorescentieprocedures. Antilichamen gericht tegen *Legionella*-antigenen worden geconjugeerd op het fluorochrome-fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) om een FITC-gelabeld antilichaamreagens te vormen.

Te testen isolaten worden gefixeerd op een microscoopglasje en bedekt met het antilichaamreagens. Het FITC-gelabelde antilichaam zal specifiek binden aan elke in het isolaat aanwezige *Legionella*-antigeen. Wanneer er geen *Legionella*-antigeen aanwezig is zal het antilichaamreagens niet binden en wordt verwijderd in de wasstap.

Het FITC-gelabelde antilichaam-antigeencomplex wordt gedetecteerd door het objectglasje bloot te stellen aan ultraviolet of blauwviolet licht. Door excitatie met ultraviolet of blauwviolet licht zal het FITC fluoresceren in de langere (zichtbare) golflengten en een blauw/groene of geel/groene kleur produceren. *Legionella*-cellen worden onder deze omstandigheden zichtbaar als felgeel-groene bacillen.

BESCHIKBARE REAGENTIA EN MATERIALEN

Legionella pneumophila, enkele serogroep FITC-geconjugeerde konijnantisera. Antisera geprepareerd in konijnen tegen *L. pneumophila* serogroepen 2 tot 14 worden geconjugeerd met FITC. De FITC-geconjugeerde antisera worden gebruiksklaar geleverd. Rhodamine-isothiocyanaat (een fluorochrome-fluorescerend middel dat op een andere golflengte fluoresceert dan FITC) geconjugeerd aan normaal konijnenserum is aanwezig in het reagens als een tegenkleurstof ¹¹ en er is 0,1% natriumazide aan toegevoegd als conserveringsmiddel.

De volgende FITC-antilichaam(konijn)reagentia zijn verkrijgbaar:

Cat.#		
PL.205	<i>Legionella</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 2	0,5 ml
PL.206	<i>Legionella</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 3	0,5 ml
PL.207	<i>Legionella</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 4	0,5 ml
PL.208	<i>Legionella</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 5	0,5 ml
PL.209	<i>Legionella</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 6	0,5 ml
PL.276	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 7	0,5 ml
PL.277	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 8	0,5 ml
PL.278	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 9	0,5 ml

PL.279	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 10	0,5 ml
PL.280	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 11	0,5 ml
PL.281	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 12	0,5 ml
PL.282	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 13	0,5 ml
PL.283	<i>L. pneumophila</i> DFA-reagens. <i>L. pneumophila</i> serogroep 14	0,5 ml

VOORZORGSMAATREGELEN

1. Reagentia zijn UITSLUITEND VOOR DIAGNOSTISCH GEBRUIK IN VITRO.
2. Reagentia niet gebruiken na de op het productlabel vermelde uiterste gebruiksdatum.
3. Conjugaat en antigeenreagentia bevatten 0,1% natriumazide. ⚠ Wanneer het de kans krijgt op te hopen kan natriumazide explosief reageren met lood of koper. Hoewel de hoeveelheid natriumazide in de reagentia minimaal is dient men grote hoeveelheden water te gebruiken bij het door de gootsteen spoelen van gebruikt reagens.
4. Monsters van patiënten en kweekisolaten moeten worden gezien als mogelijk besmettelijk en men dient voorzorgsmaatregelen te treffen die passend zijn voor microbiologische gevaren.
5. Verwerk de objectglasjes afzonderlijk en vermijd kruisbesmetting met kleur reagentia.
6. Laat het kleurreagens nooit op het objectglasje opdrogen tijdens de kleuringsprocedure.
7. Interpretatie dient gedaan te worden door personeel dat ervaring heeft in fluorescentiemicroscopie en directe fluorescentie-antilichaamprocedures.
8. Voor het verkrijgen van geldige testresultaten dient men zich te houden aan de procedures, opslagcondities, voorzorgsmaatregelen en beperkingen gespecificeerd in deze richtlijnen.

OPSLAG

FITC-antilichaamconjugaatreagentia:
In het donker bij 2°-8° C bewaren. Conjugaat is tot de uiterste gebruiksdatum vermeld op het label stabiel. Niet invriezen.

AFNAME EN PREPARATIE VAN MONSTERS

1. Afname en kweek

Geschikte klinische monsters dienen afgenomen te worden met behulp van medische standaardprocedures. Monsters dienen zo snel mogelijk na afname gekweekt te worden volgens de geaccepteerde procedures voor *Legionella* (zie referentie ⁶ voor een voorbeeld). Voor *Legionella* is gewoonlijk minstens 48 uur nodig alvorens groei merkbaar is en het kan ongeveer 10 dagen nodig hebben wanneer het isolaat verontreinigd is met andere micro-organismen of wanneer de patiënt antibiotica heeft gekregen ⁶.

2. Preparatie van kweekuitstrijkjes:

PROCES IN BIOLOGISCHE VEILIGHEIDSKAST

- a. Maak een licht troebele suspensie (McFarland No.1) van koloniën van kweken waaraan wordt aangenomen dat zij *Legionella* zijn in 1% neutrale formaline.
- b. Prepareer uitstrijkjes op een dubbele ring of multi-well objectglasje Voor het testen heeft men drie sets objectglasjes nodig.
- c. Droog aan de lucht en verwarm voorzichtig.
- d. Fixeer uitstrijkje gedurende 10 minuten in 10% neutrale formaline.
- e. Draineer en spoel met gedestilleerd water, droog de objectglasjes daarna aan de lucht.

3. Preparatie van controle-antigeenuitstrijkjes:

Elke geteste set kweekisolaten dient uitstrijkjes te bevatten van het polyvalente positieve controle-antigeen (PL.285). Prepareer de uitstrijkjes op de in bovenstaand nummer 2 aangegeven wijze.

BENODIGDE MAAR NIET GELEVERDE MATERIALEN

1. Positieve controle-antigeen (verkrijgbaar bij Pro-Lab in 1 ml formaat) Cat # PL.285 (*L. pneumophila* serogroep 1 tot 14)
2. Negatief controle-reagens (verkrijgbaar bij Pro-Lab in 2 ml formaat) Cat # PL.213A Konijnimmunoglobuline-geconjugeerd FITC
3. Fosfaatbuffer fysiologische zoutoplossing (verkrijgbaar bij Pro-Lab als 100 ml 10 X concentraat) Cat # PL.212
4. Preparatiemedia (verkrijgbaar bij Pro-Lab in 10 ml formaat) Cat # PL.213
5. Biologische veiligheidskast.
6. Bunsenbrander.
7. Coplin-bakken.
8. Schone microscoopglasjes geschikt voor fluorescentiemicroscopie.
9. Afdekglaasjes.
10. Immersie-olie.
11. Gebufferd houtskoolglistextractmedium (BCYE).
12. Incubator (35°-37° C).
13. Entingslus.
14. Vocht kamer.
15. Steriel gedestilleerd water.
16. Steriele petri-schaaltjes.
17. Neutrale formaline (10%)
18. Fluorescentiemicroscop (doorvallend of invallend licht).
Monoculaire of binoculaire fluorescentiemicroscop met 40x en 100x (olie-immersie) objectieven en de volgende apparatuur (of equivalent):
Doorvallende verlichting
- cardioide donker-veld condensor
- 200W ultra-hogedruk kwiklamp, 105 W hogedruk xenonlamp of 100 Wwolframhalogeenlamp.
- KG 1 of B1/K2 warmte-absorberend filter. BG 38 of BG 23 rood suppressiefilter. KP 490 of 2 x KP 490 bekrachtigingsfilter. K 510 of K 515 barrièrefilter.

Invallende verlichting

- 50W, 100W of 200 W ultra-hogedruk kwiklamp, 75 W of 150 W hogedruk xenonlamp of 50 W of 100 W wolframhalogeenlamp.
- KG 1 of B1/K2 warmte-absorberend filter. BG 38 of BG 23 rood suppressiefilter. KP 490 of 2 x KP 490 bekrachtigingsfilter. TK 510 dichrone straalverdelingspiegel en K 510 of K 515 barrièrefilter.

Wolframhalogeenlampen kunnen niet altijd met succes worden gebruikt bij binoculaire microscopen voor doorvallende of invallende verlichting.

TESTPROCEDURE

1. Breng monovalent conjugaat aan op het eerste weefselobjectglasje en negatieve controleconjugaat op het tweede objectglasje. De volledige portie van het objectglasje met het kweekisolaatuitstrijkje dient bedekt te worden met conjugaatreagens.
2. Plaats de objectglasjes in een vochtige kamer en incubeer gedurende 20 tot 30 minuten bij 37° C.
3. Spoel de objectglasjes afzonderlijk voorzichtig af met PBS om de conjugaten te verwijderen.
4. Dompel de objectglasjes gedurende 5 minuten onder in individuele coplin-bakken die PBS bevatten.
5. Spoel de objectglasjes af met gedestilleerd water en droog aan de lucht. Na het drogen dienen de objectglasjes geprepareerd en onmiddellijk onderzocht te worden. De objectglasjes die niet onmiddellijk bekeken kunnen worden kunnen gedurende maximaal 24 uur in het donker worden bewaard.
6. Voeg 4 tot 5 druppels preparatiemidum toe aan het objectglasje en breng ee afdekglaasje aan.
7. Onderzoek de objectglasjes met een fluorescentiemicroscop onder een matig sterk (ca. - 40 x) objectief. Onderzoek onder een sterk (100 x) olie-immersieobjectief wanneer fluorescerende bacillen worden opgemerkt, om te bevestigen.

KWALITEITSCONTROLE

Bij elke test moet zowel het polyvalente positieve controle-antigeen als het negatieve controle-conjugaat worden gebruikt. Aan alle gespecificeerde criteria in onderstaand deel 1a, 1b en 1c van Interpretatie van Resultaten dient voldaan te zijn om de test geldigheid



te geven. Wanneer aan een van de criteria niet is voldaan deze testresultaten niet rapporteren.

INTERPRETATIE VAN RESULTATEN

Legionella-bacillen zijn pleiomorf en behandeling met antibiotica kan leiden tot een vertraagde verschijning van koloniën in kweek en organismen met niet-karakteristieke morfologie.

- Om een test geldigheid te geven moet aan de volgende criteria worden voldaan.
 - Kleuring MOET minimaal 3+ zijn met normale morfologie om een bacil positief te laten scoren.
 - 4+ = felgeel-groene celwandkleuring.
 - 3+ = helgeel-groene celwandkleuring.
 - 2+ = dofgeelgroene kleuring. Celwand niet goed gedefinieerd.
 - 1+ = diffuus, vaag geelgroene kleuring van cel.
 - In de test gebruikte monovalente conjugaten moeten 3+ tot 4+ kleuring produceren bij het Polyvalente positieve controle-antigeen.
 - Het negatieve controleconjugaat mag de testmonsters niet kleuren.
- Wanneer is voldaan aan alle criteria in bovengenoemd deel 1, evalueer de testresultaten dan als volgt⁸.
 - Hel-fluorescerende bacillen (3+ of sterker): rapporteer als FA-positief voor de betreffende serogroep(en) of species (zie 3 en 4 hieronder).
 - Geen hel-fluorescerende bacillen: rapporteer als FA-negatief.
- Een positief resultaat met een monovalent conjugaat geeft aan dat de specifieke serogroep of het species aangegeven door dat conjugaat aanwezig is in het isolaat.

BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

- De DFA-test is presumptief voor de identificatie van *Legionella pneumophila* serogroepen 2 tot 14. Een positief resultaat dient bevestigd te worden door het beoordelen van groeiveristen en biochemische technieken voor *Legionella*-bacteriën.
- Een negatieve DFA-test sluit de aanwezigheid van andere *Legionella*-species of serogroepen dan die waarvoor het isolaat is getest niet uit.
- Gemengde kweken die andere *Legionella*-serogroepen of -species bevatten dan die waarvoor het isolaat is getest samen met kleine aantallen *Legionella pneumophila* serogroepen 2 tot 14 kunnen ook negatieve resultaten geven wanneer het aantal van deze laatste zeer laag is. Het gebruik van isolaten verkregen uit enkele koloniën kunnen de waarschijnlijkheid van het zich voordoen hiervan verminderen.
- Niet-specifieke fluorescentie kan optreden bij bepaalde stammen van *Staphylococci*, *Streptococci*, *Flavobacterium*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Eikkenella corodens*, *Pseudomonas* including *P. fluoresces*, *P. maltophila*, *P. aeruginosa*, *P. putida* en andere Gram-negatieve stoffjes, als gevolg van natuurlijke antilichamen in het serum van geïmmuniseerde konijnen of als gevolg van niet-specifieke binding van conjugaat aan celwandcomponenten¹². Niet-specifieke fluorescentie kan gewoonlijk worden onderscheiden van de specifieke reactie met *Legionella* op morfologische gronden wanneer men bekend is met de normale morfologie en kleuring en kleuringskenmerken van *Legionella*-bacillen^{9,10}.
- Het gebruik van deze reagentia rechtstreeks met monsters van patiënten of voor andere preparaten dan klinische kweekisolaten is niet vastgesteld.

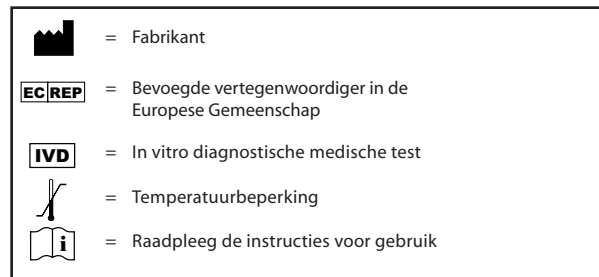
REFERENTIES

- 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 3-30.
- 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.

Tevens verkrijgbaar bij Pro-Lab:

- PL.241 *Legionella pneumophila* serogroep 1 DFA-set
[Bevat *Legionella pneumophila* serogroep 1 DFA-reagens (FITC- monoklonale muisantilichamen)] 50 tests
- PL.242 *Legionella pneumophila* serogroep 1 tot 14 DFA-set
[Bevat *Legionella pneumophila* serogroep 1 tot 14 DFA-reagens (FITC- monoklonale muisantilichamen)] 50 tests



Deze gebruiksaanwijzing werd professioneel vertaald op basis van de originele Engelse versie. Neem contact op met Pro-Lab als de tekst niet eenduidig is of als u discrepanties vaststelt.