

USO PROPUESTO

The Direct Fluorescent Antibody Reagent is intended for the presumptive (serological) identification of *Legionella pneumophila* serogrupo 1 from culture isolates^{1,2}.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Legionella pneumophila serogrupo 1 es el agente etiológico más común de la enfermedad del legionario y una de los aislamientos más frecuentes de *Legionella* en muestras ambientales³. Las técnicas disponibles más utilizadas para la identificación en laboratorio de los aislamientos de *Legionella*, son los métodos serológicos que se basan en antisueros de conejos hiperinmunizados, que contienen anticuerpos dirigidos contra el lipopolisacárido somático o antígeno "O"⁴. Sin embargo, muchas especies y serogrupos de *Legionella* tienen antígenos en común⁵, detectándose reacciones cruzadas cuando se utilizan anticuerpos policlonales para la identificación⁵. El kit *Legionella pneumophila* serogrupo 1 DFA Kit utiliza anticuerpos monoclonales marcados con FITC, que ofrecen una alta sensibilidad y una identificación específica de *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

Legionella puede ser cultivada a partir de una variedad de muestras clínicas⁶ y el test de fluorescencia directa (DFA) puede ser usado para identificar *Legionella* en esos cultivos. Aunque el test DFA es sensible y altamente específico, el diagnóstico debería ser confirmado por métodos bioquímicos siempre que sea posible^{6,7,8}.

PRINCIPIO DEL TEST

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 son conjugados con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) para formar un anticuerpo reactivo marcado con FITC.

Los aislamientos que serán ensayados se fijan a un portaobjetos y se recubren con el anticuerpo monoclonal reactivo. El anticuerpo marcado con FITC se unirá específicamente a cualquier antígeno de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 presente en el aislamiento. Si no hay presente ningún antígeno de *Legionella pneumophila* serogrupo 1, el anticuerpo reactivo no se unirá u será eliminado en la fase de lavado.

El complejo antígeno-anticuerpo marcado con FITC se detecta exponiendo los portaobjetos a la luz ultravioleta. La excitación con luz ultravioleta provoca la fluorescencia de FITC en longitudes de onda más largas (visible) produciendo un color verde azulado o verde amarillento. En estas condiciones, las células de *Legionella* aparecerán como bacilos brillantes verde amarillentos.

REACTIVOS Y MATERIALES DISPONIBLES

- PL.310 Reactivo *Legionella pneumophila* serogrupo 1 DFA (anticuerpos mono clonales de ratón, marcados con FITC). Los anticuerpos monoclonales son preparados en ratón contra *Legionella pneumophila* serogrupo 1 y son conjugados con FITC. Los anticuerpos monoclonales conjugados con FITC se suministran listos para su uso. Isotiocianato de rodamina (un fluorocromo que produce fluorescencia a una longitud de onda distinta a FITC) conjugado con anticuerpos normales está presente en el reactivo como tinción de contraste (10) y se incluye un 0,095% de azida sódica como preservante. El reactivo DFA se presenta en viales de 0,5 ml.
- PL.312 Control positivo de antígeno *Legionella pneumophila* serogrupo 1 El cultivo de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 en un medio definido, es lisado y hervido para producir un control positivo de antígeno. Incluye un 0,095% de azida sódica como preservante. El control positivo se presenta en viales de 1,0 ml.
- PL.311 Control negativo de antígeno - *Legionella non pneumophila*. El cultivo efectuado en un medio definido es lisado y hervido para producir un control negativo de antígeno. Incluye un 0,095% de azida sódica como preservante. El control negativo se presenta en viales de 1,0 ml.
- PL.315 Medio de montaje El medio de montaje es tamponado a pH 8,5. Contiene glicerol y un agente para retardar el fotoblanqueo causado por la luz ultravioleta. Se suministra listo para el uso en viales de 5,0 ml.

PRECAUCIONES

- Los reactivos son para USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del producto.
- Los reactivos del conjugado y del antígeno contienen 0,095% de azida sódica. Si se permite acumular la azida sódica puede reaccionar explosivamente con plomo y cobre. Aunque la cantidad de azida sódica en los reactivos es mínima, deben eliminarse los reactivos con gran cantidad de agua.
- Las muestras de los pacientes y los aislamientos cultivados deben considerarse como potencialmente infecciosos y deben tomarse las precauciones adecuadas

- para la manipulación de productos de riesgo microbiológico, de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Los portaobjetos deben procesarse individualmente evitando la contaminación cruzada con los reactivos de tinción.
- Nunca se debe secar el reactivo de tinción en el portaobjetos durante el procedimiento de tinción.
- La interpretación de los resultados requiere personal con experiencia en microscopía de fluorescencia y en procedimientos de fluorescencia directa con anticuerpos.
- Para obtener resultados válidos deben seguirse los procedimientos, condiciones de conservación, precauciones y limitaciones especificadas en estas instrucciones de uso.
- El producto contiene material de origen animal y debe manejarse como potencial portador y transmisor de enfermedades.

CONSERVACIÓN

- Reactivo conjugado anticuerpo-FITC:
Conservar a 2° - 8° C en la oscuridad. El conjugado es estable hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta. No congelar.
- Control negativo:
Conservar a 2° - 8° C. El control negativo es estable hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta. No congelar.
- Control positivo:
Conservar a 2° - 8° C. El control positivo de antígeno es estable hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta. No congelar.
- Medio de montaje:
Conservar a 2° - 8° C. El medio de montaje es estable hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Colección y cultivo:
Las muestras clínicas apropiadas deben recolectarse usando procedimientos microbiológicos estándar. Las muestras deben ser cultivadas tan pronto como sea posible después de la recolección, usando procedimientos aceptados para *Legionella* (ver ejemplos en la referencia⁹). *Legionella* usualmente requerirá al menos 48 horas para que su crecimiento sea detectable, aunque puede necesitar hasta 10 días si el aislamiento está contaminado con otros microorganismos, o el paciente ha recibido antibióticos⁹.
- Preparación de las extensiones del cultivo en los Portaobjetos:
 - PROCESAR EN CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA
 - Preparar un suspensión ligera (McFarland No.1) de colonias cultivadas sospechosas de ser *Legionella*, en PBS 1%.
 - Preparar extensiones con la suspensión en portaobjetos con dos o más anillos de reacción.
 - Secar al aire y calentar suavemente.
 - Fijar la extensión con formalina neutra al 10% durante **15 minutos**.
 - Secar y lavar con agua destilada, a continuación dejar secar al aire los portaobjetos.
- Preparación de las extensiones del control de antígeno:
Cada grupo de aislamientos cultivados ensayado debe incluir extensiones del control positivo de antígeno (PL.312) y del control negativo de antígeno (PL.311) preparados como se indica en el apartado 2.

MATERIAL SUMINISTRADO

Se suministran los reactivos descritos en el apartado Reactivos y materiales disponibles

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Cabina de seguridad biológica.
- Mechero Bunsen.
- Portaobjetos limpios adecuados para la microscopía de fluorescencia.
- Cubreobjetos.
- Aceite de inmersión.
- Medio tamponado Carbón Extracto de Levadura (BCYE).
- Estufa microbiológica (35°-37° C).
- Asas de siembra.
- Cámara húmeda.
- Agua destilada estéril.

- Placas de petri estériles.
- Formalina neutra (10%)
- Microscopio de fluorescencia (de luz transmitida o incidente), monocular o binocular, con objetivos 40 x y 100 x (inmersión en aceite) y el siguiente equipo (o equivalente):
Iluminación transmitida
 - Condensador de campo oscuro
 - Lámpara de mercurio de ultra-alta presión de 200W, lámpara de xenón de alta presión de 105W o lámpara halógena de tungsteno de 100W.
 - Filtro de absorción caliente KG 1 o B1/K2. Filtro de supresión rojo BG 38 o BG 23. Filtro excitador K 4 90 o 2 x KP 490. Filtro barrera K 510 o K 515.**Iluminación incidente**
 - Lámpara de mercurio de ultra-alta presión de 50W, 100W o 200W, lámpara de xenón de alta presión de 75W o 150W, o lámpara halógena de tungsteno de 50W o 100W.
 - Filtro de absorción caliente KG 1 o B1/K2. Filtro de supresión rojo BG 38 o BG 23. Filtro excitador KP 490 o 2 x KP 490. espejo dicrónico separador de haces TK 510. Filtro de barrera K 510 o K 515.
 - Las lámparas de tungsteno no siempre pueden ser usadas con éxito en microscopios binoculares para la iluminación transmitida o incidente.
- Tampón PBS (0.01 M). Puede ser comprado a Pro-Lab con el código PL.212 PBS (concentrado 10X) para diluir 1 volumen de tampón concentrado con 9 volúmenes de agua destilada para producir PBS pH 7,5-7,7.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

- Depositar el reactivo DFA *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (anticuerpo monoclonal conjugado con FITC) sobre portaobjetos. Debe cubrirse con el reactivo conjugado toda la superficie de la extensión de la muestra en el portaobjetos.
- Depositar los portaobjetos con el reactivo conjugado en una cámara húmeda e incubar a 37° C de 20 a 30 minutos.
- Lavar suavemente los portaobjetos individualmente con PBS, para eliminar los conjugados no unidos a la extensión de la muestra.
- Lavar los portaobjetos con agua destilada y dejar secar al aire. Después del secado, los portaobjetos deberán ser montados y examinados sin retraso. Los portaobjetos que no puedan ser revisados inmediatamente, pueden ser conservados en la oscuridad durante 24 horas como máximo.
- Añadir 4 ó 5 gotas de medio de montaje al portaobjetos y cubrir la extensión de la muestra con un cubreobjetos.
- Examinar los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia, inicialmente con un objetivo de poco aumento (aprox. 40 x). Si se observan bacilos fluorescentes, examinar con un objetivo de inmersión en aceite de gran aumento (100 x) para confirmar la fluorescencia.

CONTROL DE CALIDAD

Cada test debe hacerse ensayando también el control positivo y en control negativo de antígeno. Para validar el test deben cumplirse todos los criterios especificados en la siguiente sección de "Interpretación de resultados 1a, 1b y 1c". Si alguno de estos criterios no se cumple, el test no es válido y no debe informarse.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Los siguientes criterios deben cumplirse para validar el test.
 - Para considerarse como positiva, la tinción debe ser al menos 3+ con la morfología típica de los bacilos.
 - 4+ = tinción de la pared celular verde amarillento brillante.
 - 3+ = tinción de la pared celular verde-amarillento fuerte.
 - 2+ = tinción de la pared celular verde amarillento. Pared celular no bien definida.
 - 1+ = tinción de la célula verde amarillenta tenue y difusa.
 - El conjugado reactivo DFA usado en el test debe producir una tinción 3+ a 4+ con el Control Positivo de Antígeno.
 - El Control Negativo de Antígeno no debe reaccionar con el reactivo conjugado DFA.
- Si se cumplen todos los criterios de validación de la sección 1, evaluar los resultados del test como se indica a continuación⁹.
 - Bacilos fluorescentes brillantes (3+ ó más fuerte): informar como ensayo de fluorescencia positivo.
 - Bacilos fluorescentes no brillantes: informar como ensayo de fluorescencia negativo.









LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test de fluorescencia directa (DFA) es presuntivo para identificación de *Legionella pneumophila* serogrupo 1. Un resultado positivo debería ser confirmado por requerimientos de crecimiento en cultivo y técnicas bioquímicas para bacterias del género *Legionella*.
2. Un resultado negativo del test de fluorescencia directa (DFA) no excluye la presencia de otras especies o serogrupos de *Legionella* distintos a *Legionella pneumophila* serogrupo 1.
3. Cultivos mixtos conteniendo especies o serogrupos de *Legionella* con un pequeño número de *Legionella pneumophila* serogrupo 1, pueden dar también resultados negativos del test, si la cantidad de *L.pneumophila* serogrupo 1 es muy pequeña. El empleo de aislamientos derivados de colonias individuales puede reducir la probabilidad de esta incidencia.
4. No se ha establecido el uso de estos reactivos directamente con muestras de pacientes o de preparaciones distintas a los aislamientos clínicos cultivados.

REFERENCIAS

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. **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.
4. **Wilkinson, H. W.** 1988. Legionellosis, P. 320-332. In A. Balows, W.J. Hausler, Jr., M. Ohashi, and A. Turano (ed.), *Laboratory diagnosis of infectious diseases, Principles and practice*, Vol. 1. Springer-Verlag, New York.
5. **Plikaytis, B.B., G.M. Carlone, C.P. Pau, and Wilkinson, H. W.** 1987. Purified 60-Kilodalton *Legionella* Protein with *Legionella*-Specific and Non-specific epitopes. *J. Clin. Microbiol.* 25:2080-2084.
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 13-30.
7. **Harrison, T.G., A.G. Taylor** (eds.). 1988. *A laboratory manual for Legionella*. John Wiley and Sons. Appendix 1. pp 155-156.
8. **Edelstein, P.H.** 1987. Laboratory diagnosis of infections caused by Legionellae. *Eur J. Clin. Microbiol.* 6: 4-9.
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.
10. **Kawamura A.** (ed.) 1969. *Fluorescent antibody techniques and their application*. Univ. of Tokyo Press. pp 72-73.

| | |
|---|--|
|  | = Fabricante |
|  | = Representante Autorizado en la Comunidad Europea |
|  | = Contiene suficiente para (n) test |
|  | = 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.