

IMPIEGO PREVISTO

Il kit è impiegato per l'identificazione sierologica di colonie isolate di *Legionella pneumophila* di sierogruppi da 1 a 14^{1,2}.

INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

Legionella pneumophila di sierogruppo 1 è l'agente eziologico più comune della legionellosi e uno dei microrganismi più frequenti nei campioni ambientali³.

Le tecniche più utilizzate per l'identificazione delle colonie di *Legionella* sono basate su metodi di tipo sierologico, che utilizzano anticorpi iperimmuni di coniglio, contenenti anticorpi diretti contro l'antigene somatico (un lipopolisaccaride) o antigene 'O'⁴. Comunque, molte specie e sierogruppi di *Legionella* hanno antigeni comuni⁵; cross-reagiscono quando sono usati anticorpi policlonali per l'identificazione sierologica.

Il kit DFA per *Legionella pneumophila* di sierogruppo 1 utilizza anticorpi monoclonali marcati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) che dispongono di un'alta specificità e selettività nell'identificazione di *Legionella pneumophila* di sierogruppo 1.

Legionella può essere isolata da un'ampia varietà di campioni clinici⁶ 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, questo metodo di diagnosi deve essere affiancato, quando possibile, da una caratterizzazione biochimica^{6,7,8}.

PRINCIPIO DEL METODO

Anticorpi monoclonali (diretti contro antigeni di *Legionella pneumophila* di sierogruppo 1) sono coniugati al fluorocromo, isotiocianato di fluoresceina (FITC), a formare un anti corpo marcato con FITC.

Il ceppo da testare è fissato su di un vetrino per microscopia e ricoperto con il reagente contenente l'anticorpo monoclonale. L'anticorpo marcato con FITC si legherà in modo specifico all'antigene (*Legionella* di sierogruppo 1). Se non è presente nessun antigene di *Legionella*, l'anticorpo non si legherà e verrà rimosso 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-violetto. 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

- PL.310 *Legionella pneumophila* serogroup 1 DFA Reagent (FITC-mouse monoclonal antibodies). Questo reagente è costituito da anticorpi monoclonali prodotti nel topo contro il sierogruppo 1 di *Legionella pneumophila* marcati con FITC. Il reagente con l'anticorpo è pronto per l'uso. La rodamina isotiocianato (un fluorocromo fluorescente ad una lunghezza diversa da quella del FITC) coniugata al normale siero di coniglio è presente nel reagente come colorante di contrasto, mentre come conservante è stato utilizzato sodio azide 0,095%. Il DFA reagent è confezionato in quantità di 0,5 ml per flacone.
- PL.312 Positive Control - *Legionella pneumophila* di sierogruppo 1. Coltura di *L. pneumophila* di sierogruppo 1, cresciuta su di un terreno specifico, raccolta e portata ad ebollizione al fine di produrre un antigene con funzioni di controllo positivo. Conservante è stato utilizzato sodio azide 0,095%. Il controllo positivo è confezionato in quantità di 1,0 ml per flacone.
- PL.311 Negative Control - *Legionella non pneumophila*. Coltura, cresciuta su di un terreno specifico, raccolta e portata ad ebollizione al fine di produrre un antigene con funzioni di controllo negativo. Conservante è stato utilizzato sodio azide 0,095%. Il controllo negativo è confezionato in quantità di 1,0 ml per flacone.
- PL.315-Mounting Medium Il "Mounting Medium" è tamponato a pH 8.5. La soluzione contiene glicerolo e un agente che ritarda la fotossidazione da parte della luce ultravioletta. Reagente pronto per l'uso. Il confezionamento consiste in quantità di 5,0 ml per flacone.

AVVERTENZE

- I reagenti sono destinati esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulla confezione.
- I reagenti contengono sodio azide 0,095% come conservante. 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.
- Nel maneggiare i materiali è opportuno seguire le buone pratiche di laboratorio (GLP), e considerare tutti i campioni clinici testati come materiale con un potenziale rischio biologico.

- Trattare i vetrini singolarmente ed evitare una contaminazione crociata con i coloranti.
- Non lasciare che i coloranti si asciughino sul vetrino durante la procedura di colorazione.
- L'interpretazione richiede personale con esperienza in microscopia a fluorescenza e nelle procedure di immunofluorescenza.
- Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.
- Il prodotto contiene materiale di origine animale e deve essere manipolato come potenziale portatore e trasmettitore di malattie

CONSERVAZIONE

- FITC-Antibody Conjugate Reagent: Conservare a 2°-8°C al buio. Il coniugato è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.
- Negative Control: Conservare a 2°-8°C. Il controllo negativo è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.
- Positive Control: Conservare a 2°-8°C. L'antigene di controllo è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.
- Mounting Medium: Conservare a 2°-8°C. Stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Campionamento e Coltura: I campioni devono essere messi in coltura il prima possibile, utilizzando procedure adeguate per *Legionella* (come esempio vedere il riferimento bibliografico⁶). *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 antibiotici⁶.
- Preparazione dello striscio culturale:
 - TRATTARE IL CAMPIONE SOTTO UNA CAPPA DI SICUREZZA BIOLOGICA.
 - Preparare una sospensione leggera (McFarland 1) in 1% di PBS con colonie prelevate da una coltura sospettata appartenere al genere *Legionella*.
 - Preparare uno striscio su di un vetrino con due o più pozzetti per analisi in fluorescenza.
 - Lasciare asciugare e scaldare delicatamente.
 - Fissare lo striscio in formalina neutra al 10% per **15 minuti**.
 - Scolare e sciacquare con acqua distillata, quindi lasciare asciugare.
- Preparare lo striscio dell'antigene di Controllo: Ogni gruppo di ceppi testati deve includere un Controllo Positivo (PL.312) e un Controllo Negativo (PL.311). Preparare lo striscio come al punto 2 precedente.

MATERIALE FORNITO

Reagenti descritti nel capitolo REAGENTI E MATERIALI FORNITI.

MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Cappa di sicurezza biologica.
- Becco Bunsen.
- Vetrini puliti per microscopia a fluorescenza.
- Coprivetrini.
- Olio da immersione.
- Buffered charcoal yeast extract medium (BCYE).
- Incubatore (35°-37°C).
- Anse da microbiologia.
- Camera umida.
- Acqua distillata sterile.
- Piastre petri sterili.
- Formalina neutra (10%).
- Microscopio a fluorescenza (luce incidente o trasmessa). Microscopio a fluorescenza monoculare e binoculare con obiettivi da 40x e 100x (ad immersione) e il seguente equipaggiamento:
 - Illuminazione trasmittente:
 - condensatore per campo oscuro.
 - lampada ai vapori di mercurio ad alta pressione da 200W; lampada ai vapori di

- xenon ad alta pressione 105W o lampada alogena al tungsteno da 100W.
 - KG 1 o B1/K2: filtro ad assorbimento del calore; BG 38 o BG 23: filtro di soppressione del rosso; K 490 o 2 x KP 490 filtro di eccitazione; K 510 o K 515 filtro a barriera.
 - Illuminazione incidente:
 - lampada ai vapori di mercurio ad alta pressione da 50W, 100W o 200W; lampada ai vapori di xenon ad alta pressione da 75W o 150W; lampada alogena al tungsteno da 50W o 100W.
 - KG 1 o B1/K2 filtro ad assorbimento del calore; BG 38 o BG 23 filtro di soppressione del rosso; K 490 o 2 x KP 490 filtro di eccitazione; K 510 o K 515 filtro a barriera.
 - La lampada alogena al tungsteno non sempre si accompagna con successo al microscopio binoculare sia per la luce trasmittente che incidente.
14. Tampone Fosfato Salino (0,1M). Può essere ordinato alla Pro-Lab con codice PL.212. Tampone fosfato salino (concentrazione 10X). E' fornito in quantità da 100 ml di soluzione concentrata 10X. Diluire 1 volume di soluzione concentrata con 9 volumi di acqua distillata per preparare un tampone fosfato salino a pH 7.5-7.7.

PROTOCOLLO DEL TEST

- Applicare al vetrino il reagente DFA per *L.pneumophila* di sierogruppo 1. L'intera porzione del vetrino contenente lo striscio di coltura deve essere ricoperta dal coniugato.
- Posizionare i vetrini in una camera umida e incubare per 20-30 minuti a 37°C.
- Delicatamente sciacquare individualmente i vetrini con PBS per rimuovere il coniugato.
- Sciacquare i vetrini con acqua distillata e lasciare asciugare. Quando asciutti, i vetrini devono essere montati e esaminati immediatamente. I vetrini, non visti subito, devono essere mantenuti al buio per un massimo di 24 ore.
- Aggiungere da 4 a 5 gocce di "Mounting Medium" sul vetrino e applicare il coprivetrino.
- Utilizzando un microscopio a fluorescenza, esaminare i vetrini con un obiettivo a bassa risoluzione (40x). Se si osservano bacilli fluorescenti, esaminare il preparato con un obiettivo ad immersione (100x) per avere una conferma dell'osservazione precedente.

CONTROLLO DI QUALITA'

Accompagnare ogni test con l'analisi sia del Controllo Positivo che del Controllo Negativo. Devono essere rilevati 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

- Devono essere rispettati i seguenti criteri perché il test sia valido.
 - La colorazione DEVE essere almeno 3+ con una morfologia tipica del bacillo affinché il test possa essere considerato positivo.
 - 4+ = colorazione parete cellulare di giallo/verde brillante.
 - 3+ = colorazione parete cellulare di giallo/verde luminoso.
 - 2+ = colorazione di giallo/verde spento. Parete cellulare non ben definita.
 - 1+ = colorazione cellulare di un diffuso e fioco giallo/verde.
 - Il reagente DFA coniugato ad immunofluorescenza utilizzato durante il test deve dare da 3+ a 4+ con il Controllo Positivo.
 - Il Controllo Negativo non deve reagire con il reagente DFA ad immunofluorescenza.
- Se si riscontrano tutti i criteri menzionati nella sezione 1, valutare i risultati del test come segue (9):
 - Bacilli intensamente fluorescenti (3+ o più forte): riportare come FA positivo.
 - Bacilli non intensamente fluorescenti: riportare come FA negativo.

LIMITI DEL METODO

- Il test ad immunofluorescenza è indicato per l'identificazione presuntiva di *Legionella pneumophila* di sierogruppo 1. Un risultato positivo deve essere confermato mediante la valutazione dei requisiti di crescita e le tecniche biochimiche per il genere *Legionella*.
- Un test negativo non preclude la presenza di specie e sierogruppi di *Legionella* diverse da quelle per cui il ceppo è stato analizzato (*Legionella pneumophila* di sierogruppo 1).
- Culture miste contenenti sia specie o sierogruppi di *Legionella* diversi da quelli per cui il ceppo è stato testato che piccole colonie di *Legionella pneumophila* di sierogruppo 1, potrebbero dare risultati negativi a causa della bassa quantità di

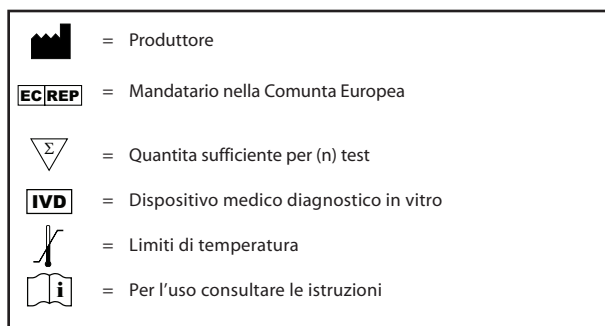


organismi. L'utilizzo di singole colonie può ridurre la probabilità di questa eventualità.

- 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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Harrison, T.G., A.G. Taylor** (eds.). 1988. *A laboratory manual for Legionella*. John Wiley and Sons. Appendix 1. pp 155-156.
- 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' disease, the bacterium and methodology*. 1979. Jones, G.L. and G.A. Hebert (eds.) USDHEW, PHS, CDC, Atlanta. pp.92-103.
- Kawamura A.** (ed.) 1969. *Fluorescent antibody techniques and their application*. Univ. of Tokyo Press. pp 72-73.



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.