

VERWENDUNGSZWECK

Das Antikörperreagenz für direkte Fluoreszenzverfahren ist für die präsumptive (serologische) Identifizierung von *Legionella pneumophila* Serotyp 1 aus Kulturisolationen bestimmt^{1,2}.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Legionella pneumophila, Serotyp 1 ist das häufigste ätiologische Agens der Legionärskrankheit und eines der am häufigsten identifizierten *Legionella*-Isolate in Umweltproben.³

Zur laborchemischen Absicherung bzw. Identifizierung von *Legionella*-Isolaten werden vorwiegend serologische Verfahren eingesetzt, bei denen hyperimmunes Kaninchen-Antiserum mit Antikörpern gegen die somatischen Lipopolysaccharide bzw. das „O“-Antigen zum Einsatz kommt.⁴ Viele *Legionella*-Arten und -Serotypen haben jedoch gleiche Antigene.⁵ Bei Verwendung polyklonaler Antikörper zur serologischen Identifizierung treten daher Kreuzreaktionen auf.⁵ Der *Legionella pneumophila*, Serotyp 1-DFA-Kit verwendet FITC-markierte, monoklonale Antikörper, die eine hochempfindliche und spezifische Identifizierung von *Legionella pneumophila*, Serotyp 1 ermöglichen.

Legionellen können aus einer Vielzahl von klinischen Proben⁶ kultiviert werden; der direkte Fluoreszenz-Antikörpertest (DFA-Test) eignet sich zur Identifizierung von *Legionellen* in solchen Kulturen. Obgleich der DFA-Test sehr empfindlich und hoch spezifisch ist, sollte die Diagnose wenn möglich stets durch laborchemische Verfahren abgesichert werden.^{6,7,8}

TESTPRINZIP

Monoklonale Antikörper gegen Antigene von *Legionella pneumophila*, Serotyp 1 sind mit dem Fluorochrom Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugiert, wodurch ein FITC-markiertes Antikörperreagenz entsteht.

Die zu testenden Isolate sind auf einem Objektträger fixiert und werden mit dem monoklonalen Antikörperreagenz überschichtet. Der FITC-markierte Antikörper bindet spezifisch an alle in dem Isolat vorhandenen Antigene von *Legionella pneumophila*, Serotyp 1. Ist kein Antigen von *Legionella pneumophila*, Serotyp 1 vorhanden, bindet der Antikörper nicht und wird im Waschschriff entfernt.

Der FITC-markierte Antikörper-Antigen-Komplex wird nachgewiesen, indem der Objektträger in ultraviolettem oder blauvioletttem Licht betrachtet wird. Durch ultraviolettes oder blauvioletttes Licht wird das FITC zur Fluoreszenz im längeren (sichtbaren) Wellenlängenbereich angeregt, was als blaugrüne bzw. gelbgrüne Farbe erkennbar wird. *Legionellen* erscheinen unter diesen Bedingungen als leuchtend gelbgrüne Bazillen.

MITGELIEFETE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- PL.310 DFA-Reagenz für (FITC-markierter monoklonaler Mausantikörper). Monoklonale Mausantikörper gegen Die FITC-markierten monoklonalen Antikörper werden gebrauchsfertig geliefert. Als Gegenfärbung ist Rodaminisothiocyanat (ein Fluorochrom, das bei einer anderen Wellenlänge als FITC fluoresziert), konjugiert an normale Antikörper, in dem Reagenz vorhanden¹⁰; 0,095% Natriumazid ist als Konservierungsmittel enthalten. Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml DFA-Reagenz.
- PL.312 Positivkontrolle - Eine Kultur von Jedes Fläschchen enthält 1,0 ml Positivkontrolle. 0,095% Natriumazid ist als Konservierungsmittel enthalten
- PL.311 Negativkontrolle - *Legionella nonpneumophila*. 0,095% Natriumazid ist als Konservierungsmittel enthalten. Eine Kultur . Jedes Fläschchen enthält 1,0 ml Negativkontrolle.
- PL.315-Eindeckmittel Das Eindeckmittel hat einen pH-Wert von 8,5. Es enthält Glycerin und ein Mittel zur Verzögerung der Ausbleichung durch ultraviolettes Licht. Es wird gebrauchsfertig geliefert. Jedes Fläschchen enthält 5,0 ml.

VORSICHTSHINWEISE

- Reagenzien sind AUSSCHLIESSLICH FÜR DIE IN VITRO DIAGNOSTIK BES TIMMT.
- Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr einsetzen.
- Konjugat und Antigenreagenzien enthalten 0,095% Natriumazid. Natriumazid kann bei Kontakt mit Kupfer oder Blei explosive Verbindungen bilden. Obwohl die Natriumazid-Konzentration in den Reagenzien sehr gering ist, sollte beim Entsorgen gebrauchter Reagenzienreste immer mit ausreichend Wasser nachgespült werden.
- Patientenproben sind als potenziell infektiös anzusehen und es sind die bei mikro-

- biologischer Gefährdung angebrachten Vorsichtsmaßnahmen zu befolgen.
- Die Objektträger sollten einzeln bearbeitet und eine Kreuzkontamination mit Färbereagenzien vermieden werden.
- Das Färbereagenz darf während der Färbung auf keinen Fall auf dem Objektträger eintrocknen.
- Die Auswertung sollte von Personal durchgeführt werden, das Erfahrung in der Fluoreszenzmikroskopie und bei der Durchführung von Antikörperverfahren mit direkter Fluoreszenz hat.
- Alle in dieser Testanleitung enthaltenen Hinweise zur Testdurchführung und Aufbewahrung sowie zu Vorsichtsmaßnahmen und Verfahrenseinschränkungen müssen genau befolgt werden, um gültige Ergebnisse zu erzielen.
- Das Produkt enthält Materialien tierischer Herkunft und sollte wie ein potenzieller Träger und Überträger von Krankheiten gehandhabt werden.

AUFBEWAHRUNG

- FITC-Antikörperkonjugat: Bei 2-8°C im Dunkeln aufbewahren. Das Konjugat ist bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nicht einfrieren.
- Negativkontrolle: Bei 2-8°C aufbewahren. Die Negativkontrolle ist bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nicht einfrieren.
- Positivkontrolle: Bei 2-8°C aufbewahren. Das Kontrollantigen ist bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nicht einfrieren.
- Eindeckmittel: Bei 2-8°C aufbewahren. Das Eindeckmittel ist bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG

- Probengewinnung und Kultivierung Geeignete klinische Proben sollten unter Anwendung von medizinischen Standardverfahren gewonnen werden. Die Proben sollten nach der Gewinnung so schnell wie möglich angezüchtet werden, wobei Standardanzuchtverfahren für Legionellen zur Anwendung kommen (als Beispiel siehe Literaturquelle ⁶). Wachstum von Legionellen ist in der Regel erst nach mindestens 48 Stunden erkennbar und kann bis zu 10 Tage dauern, wenn das Isolat mit anderen Mikroorganismen kontaminiert ist und der Patient Antibiotika erhalten hat.⁶
- Herstellung von Kulturausstrichen:
 - DURCHFÜHRUNG IN BIOLOGISCHER SICHERHEITSKAMMER
 - Eine dünne Suspension (McFarland Grad 1) mit Kolonien der mutmaßlichen *Legionellenkultur* in 1% PBS herstellen.
 - Auf Doppelfeldobjektträgern oder auf Objektträgern mit mehreren Feldern Ausstriche anfertigen.
 - Lufttrocknen und vorsichtig erhitzen.
 - Ausstrich in 10% neutralem Formalin 15 Minuten lang fixieren.
 - Objektträger abklopfen, mit destilliertem Wasser abspülen und an der Luft trocknen.
- Herstellung von Ausstrichen mit Kontrollantigen: Bei jeder Testreihe von Kultuisolaten sollten Ausstriche der Positivkontrolle (PL.312) und der Negativkontrolle (PL.311) mitgeführt werden. Die Ausstriche wie in Schritt 2 oben beschrieben herstellen.

IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Wie im Abschnitt Mitgelieferte Reagenzien und Materialien beschrieben.

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT GELIEFERTER MATERIALIEN

- Eine Arbeitsbank zur Durchführung von Arbeiten mit Biogefährdung.
- Bunsenbrenner.
- Saubere Objektträger für die Fluoreszenzmikroskopie.
- Deckgläschen.
- Immersionsöl.
- Gepuffertes Charcoal Yeast Extract Medium (BCYE-Medium).
- Inkubator (35°-37°C).
- Impföse.
- Feuchte Kammer.

- Steriles destilliertes Wasser.
- Sterile Petrischalen.
- Neutrales Formalin (10%).
- Fluoreszenzmikroskop (Transmission oder Auflicht). Monokulares oder binokulares Fluoreszenzmikroskop mit 40x- und 100x(Ölimmersions-) Objektiven und folgender Ausstattung (oder gleichwertiger Ausstattung):
 - Transmissionsbeleuchtung
 - Kardioid-Dunkelfeldkondensator
 - 200W Ultrahochdruck-Quecksilberlampe, 105W Hochdruck-Xenonlampe oder 100W Tungsten-Halogenlampe.
 - Wärmeabsorptionsfilter KG 1 oder B1/K2. Roter Suppressionsfilter BG38 oder BG23. KP 490 oder 2 x KP 490 Exciterfilter. K 510 oder K 515 Barrierefilter.
- Auflicht
 - 50W, 100W oder 200W Ultrahochdruck-Quecksilberlampe, 75W oder 150W Hochdruck-Xenonlampe oder 50W oder 100W Tungsten-Halogenlampe.
 - Wärmeabsorptionsfilter KG 1 oder B1/K2. Rotsuppressionsfilter BG38 oder BG23. KP 490 oder 2 x KP 490 Anregungsfilter. TK 510 diachronischer Strahlteiler-Spiegel und K510 oder K 515 Barrierefilter.
 - Tungstenhalogenlampen eignen sich nicht immer für binokulare Mikroskope mit Transmissions- oder Auflicht.
- Phosphatgepufferte Salzlösung (0.1 M). Erhältlich von Pro-Lab unter der Bestellnummer PL.212 Phosphatgepufferte Salzlösung (10x-Konzentrat). Es wird in einer Menge von 100 ml als 10x-Konzentrat geliefert. Zur Herstellung von phosphatgepuffertem Salzlösung pH 7,5-7,7 wird 1 Volumenteil Konzentrat mit 9 Volumenteilen destilliertem Wasser verdünnt.

TESTVERFAHREN

- Tragen Sie das DFA-Reagenz für *L. pneumophila* Serotyp 1 (FITC-markierter monoklonaler Antikörper als Konjugat) auf den Objektträger auf. Es sollte die gesamte Fläche des Objektträgers mit dem Ausstrich des Kulturisolates von dem Konjugatreagenz bedeckt sein.
- Legen Sie die Objektträger in eine feuchte Kammer und inkubieren Sie sie 20 bis 30 Minuten lang bei 37°C.
- Spülen Sie die Objektträger vorsichtig einzeln mit PBS ab, um das Konjugat zu entfernen.
- Spülen Sie die Objektträger mit destilliertem Wasser ab und trocknen Sie sie an der Luft. Nach dem Trocknen müssen die Objektträger mit einem Deckglas eingedeckelt und sofort ausgewertet werden. Objektträger, die nicht sofort ausgewertet werden können, können bis zu 24 Stunden lang im Dunkeln aufbewahrt werden.
- Geben Sie 4 bis 5 Tropfen Eindeckmittel auf den Objektträger und legen Sie ein Deckglas auf.
- Werten Sie die Objektträger im Fluoreszenzmikroskop mit einem Objektiv mit schwacher Vergrößerung (etwa 40x) aus. Sind fluoreszierende Bazillen vorhanden, sollte das Präparat zur Absicherung mit einem Immersionsobjektiv mit höherer Auflösung (100x) betrachtet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jeder Test muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten. Es müssen alle im Abschnitt Auswertung der Ergebnisse, 1a, 1b und 1c, beschriebenen Kriterien erfüllt sein, damit ein Test als gültig eingestuft werden kann. Wenn diese Kriterien nicht erfüllt sind, sind die Testergebnisse zu verwerfen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

- Damit ein Test gültig ist, müssen die folgenden Kriterien erfüllt sein.
 - Der Grad der Färbung muss mindestens 3+ sein und es muss die typische Morphologie vorhanden sein, damit ein Bazillus als positiv eingestuft werden kann.
 - 4+ = Zellwand ist brillant gelbgrün gefärbt.
 - 3+ = Zellwand ist leuchtend gelbgrün gefärbt.
 - 2+ = Schwache gelbgrüne Färbung. Zellwand nicht ausreichend definiert.
 - 1+ = diffuse, schwach gelbgrüne Färbung der Zelle.
 - Das im Test verwendete DFA-Reagenzkonjugat produziert bei der Positivkontrolle eine Färbung der Stufe 3+ bis 4+.
 - Die Negativkontrolle darf mit dem DFA-Reagenz nicht reagieren.
- Sind alle in Abschnitt 1 oben erwähnten Kriterien erfüllt, wird das Testergebnis wie folgt evaluiert.⁹
 - Hell fluoreszierende Bazillen (3+ oder stärker): Gelten als FA-positiv.



b. Keine hell fluoreszierenden Bazillen: Gelten als FA-negativ.

VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN

1. Der DFA-Test ist präsumptiv für die Identifizierung von *Legionella pneumophila*, Serotyp 1. Ein positives Testergebnis sollte durch Bestimmung von Wachstumsbedingungen und laborchemische Verfahren zum Nachweis von *Legionellen* bestätigt werden.
2. Ein negativer DFA-Test schließt das Vorhandensein von anderen Legionellenarten oder Serotypen außer *Legionella pneumophila*, Serotyp 1 nicht aus.
3. Mischkulturen mit Legionella-Arten oder -Serotypen mit einer sehr kleinen Anzahl von *Legionella pneumophila*, Serotyp 1, können ebenfalls ein negatives Ergebnis produzieren. Die Verwendung von Isolaten, die aus Einzelkolonien hergestellt wurden, verringert die Wahrscheinlichkeit eines solchen Ergebnisses.
4. Die direkte Verwendung dieser Reagenzien mit Patientenproben oder für Präparate, bei denen es sich nicht um Isolate klinischer Kulturen handelt, wurde nicht unter sucht.

QUELLEN

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 infection 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.

	= Hersteller
	= Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft
	= Enthält genügend (Material) für (n) Tests
	= Medizinprodukt für die in vitro Diagnostik.
	= Temperaturbegrenzung
	= Beachten Sie die Gebrauchsanleitung

Bei diesen Anleitungen handelt es sich um eine Fachübersetzung der englischen Originalversion. Bei Unklarheiten oder offensichtlichen Abweichungen wenden Sie sich bitte an Pro-Lab.