

DOMAINE D'APPLICATION

Le réactif d'immunofluorescence directe est réservé à l'identification à présomption (sérologique) du germe *Legionella pneumophila*, sérogrupe 1, sur des isolats de culture^{1,2}.

RESUME ET EXPLICATION

Legionella pneumophila, sérogrupe 1, est l'agent étiologique le plus souvent responsable de la maladie des légionnaires et l'un des isolats les plus fréquemment identifiés dans des échantillons environnementaux³.

Les techniques les plus disponibles utilisées pour confirmer au laboratoire l'identification des isolats de *Legionella* sont les méthodes sérologiques basées sur des antisérums de lapin hyperimmuns qui contiennent des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide somatique ou l'antigène "O".⁴ Toutefois, plusieurs espèces et sérogroupes ont des antigènes en commun³, et des réactions croisées sont observées si des anticorps polyclonaux sont utilisés pour l'identification sérologique⁵. Le kit IFD *Legionella pneumophila* sérogrupe 1, est un système qui utilise des anticorps monoclonaux marqués à l'ITCF caractérisés par une sensibilité élevée et qui permettent l'identification spécifique du germe *Legionella pneumophila*, sérogrupe 1.

Le *Legionella* peut être cultivé à partir d'une variété d'échantillons cliniques⁶ et le test d'immunofluorescence directe anticorps fluorescents directs (IFD) est utilisé pour identifier le germe *Legionella* dans ces cultures. Bien que le test IFD soit sensible et hautement spécifique, le diagnostic doit être confirmé par la caractérisation biochimique dans la mesure du possible^{6,7,8}.

PRINCIPE DU TEST

Les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes du *Legionella pneumophila*, sérogrupe 1, sont conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) pour former un réactif aux anticorps marqués à l'ITCF.

Les isolats à tester sont fixés à une lame de microscope et appliqués avec le réactif d'anticorps monoclonaux. L'anticorps marqué à l'ITCF s'agglutine uniquement à l'un des antigènes de *Legionella pneumophila*, sérogrupe 1, présent dans l'isolat. A défaut d'antigènes de *Legionella*, sérogrupe 1, le réactif d'anticorps ne s'agglutine pas et il est éliminé lors de la phase de lavage.

Le complexe antigène-anticorps marqués à l'ITCF est détecté en exposant la lame aux rayons ultraviolets ou violets bleus. L'excitation aux rayons ultraviolets ou violets bleus cause la fluorescence de l'ITCF dans les longueurs d'onde les plus longues (visibles) tout en produisant une couleur bleue/verte ou jaune/verte. Dans ces conditions, les cellules de *Legionella* apparaissent sous forme de bacilles jaunes-verts brillants.

REACTIONS ET MATERIEL DISPONIBLE

- Réactif IFD *Legionella pneumophila*, sérogrupe 1 PL.310 (anticorps monoclonaux de souris marqués à l'ITCF). Les anticorps monoclonaux anti-*L. pneumophila*, sérogrupe 1 préparés chez la souris, sont conjugués à l'ITCF. Les anticorps monoclonaux conjugués à l'ITCF sont fournis prêts à l'emploi. L'isothiocyanate de rhodamine (un fluorochrome fluo-rescent à une longueur d'onde différente de celle de l'ITCF) conjugué à des anticorps normaux est présent dans le réactif, en tant que coloration de contraste¹⁰ et de l'azide de sodium à raison de 0,095 % est inclus comme agent de conservation. Le réactif IFD est fourni dans des flacons de 0,5 ml.
- Témoin positif PL.312 - *Legionella pneumophila*, sérogrupe 1 La culture du *L. pneumophila*, sérogrupe 1, proliférée sur un milieu défini, est recueillie et bouillie pour produire un témoin antigène positif. L'azide de sodium à raison de 0,095 % est inclus comme agent de conservation Le témoin positif est fourni dans des flacons de 1,0 ml.
- Témoin négatif PL.311-*Legionella nonpneumophila*. La culture proliférée sur un milieu défini, est recueillie et bouillie pour produire un témoin antigène négatif. L'azide de sodium à raison de 0,095 % est inclus comme agent de conservation Le témoin négatif est fourni dans des flacons de 1,0 ml.
- PL.315-Milieu de montage Le milieu de montage est tamponné à un pH de 8,5. Il contient du glycérol et un agent pour retarder la photo-instabilité en raison des rayons ultraviolets. Le produit est fourni prêt à l'emploi. Il est fourni dans des flacons de 5,0 ml.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs sont réservés à l'USAGE DIAGNOSTIC IN VITRO.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption imprimée sur l'étiquette du produit.

- Les réactifs de conjugué et d'antigène contiennent de l'azide de sodium à raison de 0,095 %. L'accumulation d'azide de sodium dans les tuyauteries en cuivre ou en plomb peut provoquer une réaction explosive. En dépit de la quantité d'azide de sodium minimale que contiennent les réactifs, rincer abondamment à l'eau lors de l'élimination dans les tuyauteries.
- Prendre toutes les précautions de sécurité qui s'imposent pour manipuler, traiter et éliminer tous les échantillons de patient et les isolats de culture potentiellement infectieux.
- Traiter les lames individuellement et éviter toute contamination croisée avec les réactifs de coloration.
- Ne jamais laisser sécher les réactifs de coloration sur la lame pendant la procédure de coloration.
- L'interprétation exige un personnel expérimenté dans la microscopie à fluorescence sachant exécuter des protocoles d'immunofluorescence directe.
- Les procédures, les conditions de conservation, les précautions d'emploi et les limites d'utilisation spécifiées dans cette notice doivent être respectées pour assurer la validité des tests réalisés.
- Le produit contient des matières d'origine animale et devra être manipulé comme potentiellement susceptible de transporter et transmettre des maladies.

CONSERVATION

- Réactif de conjugué-anticorps ITCF :
Conservé entre 2°et 8°C à l'abri de la lumière. Le conjugué est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit. Ne pas congeler.
- Témoin négatif :
Conservé entre 2° et 8°C. Le témoin négatif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit. Ne pas congeler.
- Témoin positif :
Conservé entre 2° et 8°C. L'antigène témoin est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit. Ne pas congeler.
- Milieu de montage :
Conservé entre 2°-8°C. Il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit.

PREPARATION DES ECHANTILLONS ET MISE EN CULTURE

- Prélèvement et mise en culture :
Prélever les échantillons cliniques selon les protocoles médicaux standard. Les échantillons doivent être repiqués aussitôt que possible après le prélèvement selon les procédures acceptées pour *Legionella* (pour un exemple, voir référence⁹). *Legionella* exige normalement un délai de 48 heures minimum pour pouvoir détecter la prolifération et peut prendre jusqu'à 10 jours si l'isolat est contaminé par d'autres microorganismes ou si le patient a reçu des antibiotiques⁶.
- Préparation des frottis de culture :
• PROCESSUS DANS L'ENCEINTE DE BIOSECURITE
• Effectuer une mise en suspension légère (McFarland No.1) de colonies de cultures susceptibles d'être du germe *Legionella* dans 1 % de STP.
• Préparer des frottis sur double cercle ou sur des lames à multicupules.
• Sécher à l'air et chauffer doucement.
• Fixer le frottis dans 10 % de formol neutre pendant 15 minutes.
• Drainer et rincer à l'eau distillée et sécher les lames à l'air.
- Préparation des frottis d'antigène témoin:
Chaque ensemble d'isolats de culture testée doit inclure des frottis de l'antigène positif (PL.312) et de l'antigène négatif (PL.311). Préparer les frottis comme décrit au point 2.

MATERIEL FOURNI

Réactifs comme décrit à la section Réactifs et matériel disponibles

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Enceinte de biosécurité.
- Bec Bunsen.
- Lames pour microscope propres qui conviennent à la microscopie fluorescente.
- Lamelles.
- Huile d'immersion.
- Milieu à l'extrait de levure et au charbon tamponné (MTCL).
- Incubateur (35°-37°C).
- Anse d'ensemencement.

- Chambre humide.
- Eau distillée stérile.
- Boîtes de Petri stériles.
- Formol neutre (10%)
- Microscope à fluorescence (lumière transmise ou incidente). Microscope à fluorescence équipé d'objectifs 40x et 100x (immersion dans l'huile) et du matériel suivant (ou équivalent) :
Lumière transmise
• Condensateur cardioïde
• Lampe à vapeur de mercure, pression ultra-élevée, 200W, lampe au xénon haute pression, 105W ou lampe halogène au tungstène, 100W.
• Filtre anticalorique KG 1 ou B1/K2. Filtre de suppression rouge BG 38 ou BG 23. K 4 90 un filtre d'excitation K 4 90 ou 2 filtres d'excitation KP 490. Filtrebarrière K 510 ou K 515.
Eclairage incident
• Lampe au mercure pression ultra-élevée 50W, 100W ou 200W, lampe au xénon haute pression 75W ou 150W ou lampe halogène au tungstène 50W ou 100W
• Filtre anticalorique KG 1 ou B1/K2. BG Filtre de suppression rouge BG 38 ou BG 23. 1 ou deux filtres d'excitation KP 490. Miroir de séparation à faisceau dichroïque TK 510 et filtre à barrière K 510 ou K 515
• Il n'est pas toujours possible d'utiliser les lampes halogènes au tungstène avec des microscopes binoculaires pour un éclairage transmis ou incident.
- Soluté tamponné au phosphate (0,1 M) . Il est possible de l'acheter chez Pro-Lab en tant que Soluté tamponné au phosphate PL.212 (concentré 10X). Il est fourni en doses de 100 ml de concentré 10X. Diluer 1 volume de concentré avec 9 volumes d'eau distillée pour obtenir un soluté tamponné au phosphate au pH 7,5-7,7.

PROTOCOLE DE TEST

- Appliquer le réactif IFD *L. pneumophila*, sérogrupe 1 (Conjugué d'anticorps monoclonaux et d'ITCF) sur la lame du tissu. Toute la partie de la lame contenant le frottis de l'isolat de culture doit être couverte de réactif conjugué.
- Placer les lames dans une chambre humide et incubé pendant une période allant de 20 à 30 minutes à 37°C.
- Rincer délicatement les lames, une par une avec le STP pour éliminer les conjugués.
- Rincer les lames à l'eau distillée et sécher à l'air. Après séchage, monter les lames et les examiner sans tarder. Les lames qu'il est impossible d'examiner immédiatement peuvent être conservées pendant 24 heures au maximum.
- Ajouter 4 à 5 gouttes de milieu de montage à la lame et la recouvrir d'une lamelle..
- Examiner les lames à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un objectif faible puissance (environ- 40x). Si des bacilles fluorescents sont observés, examiner avec un objectif haute puissance (100x) et immersion d'huile, pour obtenir une confirmation.

CONTROLE DE QUALITE

Exécuter les antigènes témoin positif et témoin négatif avec chaque test. Tous les critères spécifiés dans l'interprétation des Résultats, sections 1a, 1b et 1c ci-dessous, doivent être satisfaits pour qu'un test soit valable. Ne pas indiquer les résultats de test si aucun de ces critères n'est satisfait.

INTERPRETATION DES RESULTATS

- Les critères suivants, doivent être satisfaits pour qu'un test soit valable.
 - La coloration DOIT être au moins 3+ avec la morphologie type d'un bacille, pour que le résultat soit positif.
4+ = coloration de la paroi cellulaire jaune-vert brillant.
3+ = coloration de la paroi cellulaire jaune-vert vif.
2+ = coloration jaune-vert terne. Paroi cellulaire mal définie.
1+ = diffuse, coloration jaune-verte faible de la cellule.
 - Le conjugué de réactif IFD utilisé dans le test doit produire une coloration 3+ à 4+ avec l'antigène témoin positif.
 - Le témoin négatif ne doit pas réagir avec le réactif IFD.
- Si tous les critères de la section 1 ci-dessus sont satisfaits, évaluer les résultats de test comme suit⁹.
 - Bacilles fluorescents lumineux (3+ ou plus fort) : rapporter le résultat comme IF-positif.
 - Pas de bacilles fluorescents lumineux : rapporter le résultat comme IF-négatif.









LIMITES

1. Le test IFD est à présomption pour l'identification du *Legionella pneumophila*, sérotype 1. Un résultat positif doit être confirmé par l'évaluation des conditions requises de prolifération et des techniques biochimiques pour les bactéries de *Legionella*.
2. Un test IFD négatif ne préclut pas la présence d'espèces ou de sérotypes de *Legionella* autres que *Legionella pneumophila*, sérotype 1.
3. Les cultures mixtes contenant des espèces ou des sérotypes de *Legionella* avec un faible nombre de *Legionella pneumophila*, sérotype 1, peuvent également donner des résultats négatifs si la quantité est très faible. L'utilisation d'isolats dérivés des colonies simples peut réduire la susceptibilité de cette survenue.
4. L'utilisation directe de ces réactifs sur les échantillons du patient ou pour des préparations autres que les isolats de culture cliniques n'a pas été définie.

BIBLIOGRAPHIE

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' 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.

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | = Fabricant |
|  | = Représentant légal dans la communauté européenne |
|  | = Contenu suffisant pour (n) tests |
|  | = Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|  | = Limite de température |
|  | = Consulter la notice d'utilisation |

Ce mode d'emploi est une traduction professionnelle de la version anglaise d'origine. En cas d'ambiguïté ou de divergence flagrante, veuillez consulter le Service de soutien de Pro-Lab.