

#### BEOOGD GEBRUIK

Het Directe Fluorescentie-antilichaamreagens is bedoeld voor de presumptieve (serologische) identificatie van *Legionella pneumophila* serogroep 1 uit kweekisolaten<sup>1,2</sup>.

#### SAMENVATTING EN VERKLARING

*Legionella pneumophila* serogroep 1 is de meest voorkomende etiologische stof van de veteranenziekte en een van de meest geïdentificeerde *Legionella*-isolaten in milieu monsters.<sup>3</sup>

De meeste beschikbare technieken gebruikt voor laboratoriumbevestiging van de identificatie van *Legionella*-isolaten zijn de serologische methoden die zijn gebaseerd op hyper-immune konijnenantiseren die antilichamen bevatten tegen de somatische lipopolysaccharide of het "O" antigeen.<sup>4</sup> Veel *Legionella* species en serogroepen hebben echter antigenen gemeen<sup>5</sup>, kruisreacties worden aangetroffen bij gebruik van polyklonale antilichamen voor serologische identificatie<sup>5</sup>. De *Legionella pneumophila* serogroep 1 DFA kit maakt gebruik van FITC-gelabelde monoklonale antilichamen dat uiterst gevoelige en specifieke identificatie bieden van de *Legionella pneumophila* serogroep 1.

*Legionella* kan worden gekweekt vanuit een verscheidenheid aan klinische monsters<sup>6</sup> 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<sup>6,7,8</sup>.

#### PRINCIPE VAN DE TEST

Monoklonale antilichamen gericht tegen *Legionella pneumophila* serogroep 1 antigenen worden geconjugeerd op het fluorochrome-fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) om een FITC-gelabeld antilichaamreagens te vormen.

Te testen isolaten worden aangebracht op een microscoopglasje en bedekt met het monoklonale antilichaamreagens. Het FITC-gelabelde antilichaam zal specifiek binden aan elk in het isolaat aanwezige *Legionella pneumophila* serogroep 1 antigeen. Wanneer er geen *Legionella* serogroep 1 antigeen aanwezig is zal het antilichaamreagens niet binden en wordt verwijderd in de wasfase.

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

- Het PL.310 *Legionella pneumophila* serogroep 1 DFA-reagens (FITC-muis monoklonale antilichamen). Monoklonale antilichamen geprepareerd in muizen tegen *L. pneumophila* serogroep 1 worden geconjugeerd met FITC. De FITC-geconjugeerde monoklonale antilichamen worden gebruiksklaar geleverd. Rhodamine-isothiocyanaat (een fluorochrome-fluorescerend middel dat op een andere golflengte fluoresceert dan FITC) geconjugeerd aan normale antilichamen is aanwezig in het reagens als een tegenkleurstof<sup>10</sup> en er is 0,095% natriumazide aan toegevoegd als conserveringsmiddel. Het DFA-reagens is verpakt als 0,5 ml per flesje.
- PL.312 Positieve controle - *Legionella pneumophila* serogroep 1 kweek van *L. pneumophila* serogroep 1 wordt gekweekt op een bepaald medium, verzameld en gekookt om een positieve antigeencontrole te produceren. 0,095% natriumazide aan toegevoegd als conserveringsmiddel. De positieve controle is verpakt als 1,0 ml per flesje.
- PL.311 Negatieve controle - *Legionella nonpneumophila*. De kweek wordt op een bepaald medium gekweekt, verzameld en gekookt om een negatieve antigeencontrole te produceren. 0,095% natriumazide aan toegevoegd als conserveringsmiddel. De negatieve controle is verpakt als 1,0 ml per flesje.
- PL.315-Preparatiemedium Het preparatiemedium wordt gebufferd op pH 8,5. Het bevat glycerol en een stof om ultraviolet veroorzaakt door ultraviolet licht te vertragen. Gebruiksklaar geleverd. Het is verpakt als 5,0 ml per flesje.

#### VOORZORGSMAATREGELEN

- Reagentia zijn UITSLUITEND VOOR DIAGNOSTISCH GEBRUIK IN VITRO.
- Reagentia niet gebruiken na de op het productlabel vermelde uiterste gebruiksdatum.
- Conjugaat en antigeenreagentia bevatten 0,095% 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.
- Monsters van patiënten en kweekisolaten moeten worden gezien als mogelijk besmettelijk en men dient voorzorgsmaatregelen te treffen die passend zijn voor microbiologische gevaren.
  - Verwerk de objectglasjes afzonderlijk en vermijd kruisbesmetting met kleur-reagentia.
  - Laat het kleur-reagens nooit op het objectglasje opdrogen tijdens de kleur-procedure.
  - Interpretatie dient gedaan te worden door personeel dat ervaring heeft in fluorecentiemicroscopie en directe fluorescentie-antilichaamprocedures.
  - Voor het verkrijgen van geldige testresultaten dient men zich te houden aan de procedures, opslagcondities, voorzorgsmaatregelen en beperkingen gespecificeerd in deze richtlijnen.
  - Het product bevat materiaal van dierlijke oorsprong en dient behandeld te worden als mogelijke drager en overbrenger van ziekten

#### OPSLAG

- FITC-antilichaamconjugaatreagens: In het donker bij 2°-8° C bewaren. Conjugaat is tot de uiterste gebruiksdatum op het label stabiel. Niet invriezen.
- Negatieve controle: Bewaren bij 2°-8° C. Negatieve controle is tot de op het label vermelde uiterste gebruiksdatum stabiel. Niet invriezen.
- Positieve controle: Bewaren bij 2°-8° C. Controle-antigeen is tot de op het label vermelde uiterste gebruiksdatum stabiel. Niet invriezen.
- Preparatiemedium: Bewaren bij 2°-8° C. Stabiel tot de op het label vermelde uiterste gebruiksdatum.

#### AFNAME EN PREPARATIE VAN MONSTERS

- 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<sup>6</sup> 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<sup>6</sup>.
- Preparatie van kweekuitstrijkjes:
  - PROCES IN BIOLOGISCHE VEILIGHEIDSKAST
  - a. Maak een lichte suspensie (McFarland No.1) van koloniën van kweken waarvan wordt aangenomen dat zij *Legionella* zijn in 1% PBS.
  - Prepareer uitstrijkjes op dubbele ring of multi-well-objectglasje.
  - Droog aan de lucht en verwarm voorzichtig.
  - Fixeer uitstrijkjes gedurende **15 minuten** in 10% neutrale formaline.
  - Draineer en spoel met gedestilleerd water, droog de objectglasjes daarna aan de lucht.
- Preparatie van controle-antigeenuitstrijkjes: Elke geteste set kweekisolaten dient uitstrijkjes te bevatten van het positieve (PL.312) en negatieve controle-antigeen (PL.311). Prepareer de uitstrijkjes op de in bovenstaand nummer 2 aangegeven wijze.

#### GELEVERD MATERIAAL

Reagentia als beschreven in beschikbare reagentia en materialen

#### BENODIGDE MAAR NIET GELEVERDE MATERIALEN

- Biologische veiligheidskast.
- Bunsen-brander.
- Schone microscoopplaatjes geschikt voor fluorecentiemicroscopie.
- Afdekslips.
- Dompelolie.
- Gebufferd houtskoolgistextractmedium (BCYE).
- Incubator (35°-37° C).
- Entingslus.
- Vochtkamer.

- Steriel gedestilleerd water.
- Steriele petri-schaaltjes.
- Neutrale formaline (10%)
- Fluorecentiemicroscop (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 W tungsten-halogenlamp.
  - KG 1 of B1/K2 warmte-absorberend filter. BG 38 of BG 23 rood suppressiefilter. K4 90 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 tungsten-halogenlamp.
  - 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 dichrome straalverdelingspiegel en K 510 of K 515 barrièrefilter.
  - Tungsten-halogenlampen kunnen niet altijd met succes worden gebruikt bij binoculaire microscopen voor doorvallende of invallende verlichting.
- Fosfaat-gebufferde fysiologische zoutoplossing (0,1 M) Dit kan bij Pro-Lab worden gekocht als PL.212 Fosfaat-gebufferde fysiologische zoutoplossing (10 X concentraat). Het wordt geleverd als 100 ml van 10X concentraat. Verdun 1 volume concentraat met 9 volumes gedestilleerd water om fosfaat-gebufferde fysiologische zoutoplossing pH 7,5-7,7 te produceren.

#### TESTPROCEDURE

- Breng *L. pneumophila* serogroep 1 DFA-reagens (FITC-monoklonaal antilichaam-conjugaat) aan op het weefselglasje. De volledige portie van het objectglasje met het kweekisolaatuitstrijkje dient bedekt te worden met conjugaatreagens.
- Plaats de objectglasjes in een vochtige kamer en incubeer gedurende 20 tot 30 minuten bij 37° C.
- Spoel de objectglasjes afzonderlijk voorzichtig af met PBS om de conjugaten te verwijderen.
- 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.
- Voeg 4 tot 5 druppels preparatiemedium toe aan het plaatje en breng een afdekslip aan.
- Onderzoek de plaatjes met behulp van een fluorescentie-microscop onder objectief met laag vermogen (ca. - 40x). Wanneer men fluorescente bacillen opmerkt, toebestudering onder olie-immersieobjectief met hoog vermogen (100x) onderzoeken.

#### KWALITEITSCONTROLE

Bij elke test moet zowel het positieve controle-antigeen als het negatieve controle-antigeen 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 melden.

#### INTERPRETATIE VAN RESULTATEN

- 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.
  - Het in de test gebruikte DFA-reagensconjugaat moet 3+ tot 4+ kleuring produceren met het positieve controle-antigeen.
  - De negatieve controle mag niet reageren met het DFA-reagens.
- Wanneer is voldaan aan alle criteria in bovengenoemd deel 1, evalueer de testresultaten dan als volgt<sup>9</sup>.
  - Hel-fluorescerende bacillen (3+ of sterker): melden als FA-positief.
  - Geen hel-fluorescerende bacillen: melden als FA-negatief.









#### BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

1. De DFA-test is presumptief voor de identificatie van *Legionella pneumophila* serogroep 1. Een positief resultaat dient bevestigd te worden door het beoordelen van groeiverreisten en biochemische technieken voor *Legionella*-bacteriën.
2. Een negatieve DFA-test sluit de aanwezigheid van species of serogroepen van *Legionella* anders dan *Legionella pneumophila* serogroep 1 niet uit.
3. Gemengde kweken die species of serogroepen van *Legionella* bevatten met kleine aantallen *Legionella pneumophila* serogroep 1 kunnen ook negatieve resultaten geven wanneer het aantal van deze laatste zeer laag is. Het gebruik van isolaten verkregen uit enkele koloniën kan de waarschijnlijkheid hiervan verminderen.
4. Het gebruik van deze reagentia rechtstreeks met monsters van patiënten of voor andere preparaten dan klinische kweekisolaten is niet vastgesteld.

#### REFERENTIES

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.

|   |   |
|---|---|
|    | = Fabrikant   |
|    | = Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap |
|  | = Bevat voldoende voor (n) testen                       |
|  | = In vitro diagnostische medische test                  |
|  | = Temperatuurbeperking                                  |
|  | = Raadpleeg de instructies voor gebruik                 |

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.