

ARBEITSANLEITUNG

(01.07.2005)

Legionella Pneumophila

Direkter Immunfluoreszenz-Nachweis für Legionella pneumophila (DFA Test)

Kat. Nr. BR 201

ANWENDUNG

Dieser Test ist ein in vitro Direktnachweis von *Legionella pneumophila* aus klinischen Abstrichen und Bakterienkolonien auf Nährböden.

BACKGROUND

Legionella pneumophila, ein gramnegatives Bakterium, wurde isoliert als ätiologisches Agens der Legionärskrankheit (einer akuten Pneumonie) und Pontiac-Fieber (einer nicht-pneumonischen, selbst limitierenden respiratorischen Infektion) (1,2). Seit dem ersten Bericht einer Isolierung des Erregers der Legionärskrankheit im Jahre 1977, wurden verschiedene Serogruppen / Serotypen beschrieben (zuletzt 16 von *L. pneumophila* und andere Spezies des Genus *Legionella*). Die jeweiligen Stämme für *L. pneumophila* und für die anderen *Legionella* Species wurden aus der Umwelt isoliert. Aber nicht alle *Legionella*-Stämme sind bei Erkrankungen des Menschen involviert. Die meisten Publikationen zeigen, daß die Mehrzahl der klinischen Isolate der Serogruppe 1 von *L. pneumophila* angehört. Wegen der Anzüchtungsschwierigkeiten von *L. pneumophila* aus klinischen und Umweltproben auf geeigneten Nährböden, wurden immunologische Nachweisverfahren entwickelt, um *L. pneumophila* mit ihren antigenen komplexen Systemen identifizieren und serologisch typisieren zu können (3,4). Ebenso sind die immunologischen Reagenzien mit konventionellen polyklonalen Antikörpern in ihren Möglichkeiten limitiert. Deshalb werden monoklonale Antikörper aus Maus-Hybridomazellen verwendet, die spezifisch mit den relevanten Antigen determinanten von *L. pneumophila* reagieren können. Mit diesen monoklonalen Antikörpern gelang es standardisierte Reagenzien für den spezifischen Nachweis und Identifikation dieser Bakterien herzustellen (5,8). Der Immunfluoreszenz-Direktnachweis (DFA Verfahren) für *L. pneumophila* verwendet monoklonale *L. pneumophila* Antikörper, die mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) konjugiert sind. Dieses immunologische Färbereagenz ermöglicht den Nachweis aller bekannten Serogruppen von *L. pneumophila* aus klinischen Abstrichen und Bakterienkulturen.

TESTPRINZIP

Klinische Abstriche oder Abstriche aus Nährbodenkolonien werden mit FITC-konjugierten anti-*L. pneumophila* Färbereagenz behandelt. Die konjugierten, monoklonalen Antikörper aus dem Färbereagenz binden sich hierbei spezifisch an die Bakterien (falls vorhanden) und bilden so Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem Abstrichmaterial aus. Nach einem Waschschrift können die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Man erkennt leuchtende, apfelgrüne fluoreszierende Bakterien (Bacilli oder Coccobacilli). Der Hintergrund oder andere eventuell vorhandene Bakterien aus dem Abstrich zeigen eine orange bis rote Gegenfärbung.

PACKUNGSINHALT

- | | |
|----------|--|
| 1 x 1ml | gebrauchsfertiges Färbereagenz in Puffer mit Protein, Evan`s -Blau und Konservierungsmittel (FITC-konjugierte mausmonoklonale Antikörper gegen <i>L. pneumophila</i>) Das Reagenz reicht für ca 50 Bestimmungen). |
| 1 x 1ml | positives Kontrollantigen (inaktivierte Bakteriensuspension) |
| 1 x 3 ml | Eindeckmittel (gepuffertes Glycerin) |
| 25 Stck | Mikroskop-Objektträger |
| 25 Stck | Transferringpipetten |
| 25 Stck | Deckgläser |
| 1 Stck | Arbeitsanleitung |

IM KIT NICHT VORGESEHENES MATERIAL

- Fluoreszenzmikroskop (Filtersystem für FITC)
- Brutschrank für 37°C
- Feuchtigkeitskammer (abgedeckte Petrischale mit feuchtem Filterpapier auf dem Boden)
- Formalin (1 %ig in Kochsalzlg.)
- Sputolysin (Behring Diagnostika) oder Dithiothreitol (Sigma)
- Waschflasche und / oder Färbeküvette

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben. Der Kit wird bei 2°-8°C aufbewahrt. Das gebrauchsfertige Färbereagenz kann für längere Zeit auch bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Vor jeder Anwendung wird das Reagenz auf mikrobielle Kontamination überprüft.

PROBEMATERIAL

Klinische Proben (Sputum, Bronchial-Lavage, Lungengewebe) werden entsprechend den Standardvorschriften entnommen und gesammelt. Sie müssen sorgfältig bearbeitet werden, da Gefahr bestehen könnte, daß das Untersuchungsmaterial HIV-kontaminiert ist. Frische oder frisch eingefrorene Proben können für den Direktnachweis verwendet werden.

ABSTRICHPRÄPARATE

Respiratorische Flüssigkeiten

Direkte Abstriche von Sputumproben werden auf einer Objektträgerauftragstelle mit Hilfe eines sterilen Abstrichtupfers angefertigt. (Fortfahren mit der **Färbeprozedur**)

Viskoses Sputummaterial wird mit Dithiothreitol oder Sputolysin entsprechend den Standardmethoden verflüssigt. Verflüssigte Sputumproben werden erst 5 min bei 1500 x g zentrifugiert und davon 1–2 Tropfen der Boden nahen Schicht auf einer Auftragsstelle eines Objektträgers mit einer Transferpipette plaziert und ausgebreitet. (Fortfahren mit der **Färbeprozedur**).

Proben aus **Bronchialwaschungen** oder **-Lavage** werden zuerst durch Zentrifugation (1500 x g / 10 min) aufkonzentriert. Der Überstand bis auf einen Rest verworfen (0,5 ml). Das Sediment wird darin resuspendiert. 1–2 Tropfen Suspension mit einer Transferpipette auf das Auftragsfeld eines Objektträgers plazieren und verteilen (Fortfahren mit der **Färbeprozedur**).

Organismen aus Bakterienkultur

Verdächtige Bakterienkolonien mit einer Impföse aus der Kulturplatte entnehmen und in einem Volumen von 0,5 ml an 1%igem Formalin in physiologischer Kochsalzlösung suspendieren. 1–2 Tropfen dieser Suspension auf eine Auftragstelle eines Objektträgers mit einer Transferpipette überführen und ausbreiten. Die überstehende Flüssigkeit mit der Transferpipette absaugen und verwerfen (Fortfahren mit der **Färbeprozedur**).

Kontrollantigen

Das im Testkit mitgelieferte positive Kontrollantigen gut durchmischen. 1–2 Tropfen dieser Suspension auf die Auftragstelle eines Objektträgers mit einer Transferpipette überführen und ausbreiten. Den überstehenden Flüssigkeitsrest mit der Transferpitte absaugen und verwerfen. Diese Kontrolle muß bei jedem Test mitgeführt werden (Fortfahren mit der **Färbeprozedur**).

Beachte

- Getrennte Objektträger und neue Transferpipetten für die Ausstriche von individuellen klinischen Proben verwenden. Von jeder Probe doppelte Ausstriche anfertigen. Positives Kontrollantigen mit eigener Pipette auf eigener Auftragstelle ansetzen. Falls das positive Kontrollantigen keine Fluoreszenz aufweist, kann der Nachweis nicht ausgewertet werden und **ist zu wiederholen**.

FÄRBEPROZEDUR

1. Probenausstriche an der Luft trocknen lassen und Hitze fixieren durch schnelles Bewegen der Objektträger durch eine Flamme.
2. Auf die abgekühlten Objektträger 15–20 µl Färbereagenz (monoklonale anti-*L. pneumophila* Antikörper FITC konjugiert) auf Testproben und Kontrollantigen geben.
3. Objektträger in einer feuchten Kammer 30 min bei 37°C inkubieren. Den Reagenzüberschuß absaugen oder den Objektträger mit einem Filterpapier abtupfen (den Objektträger nicht austrocknen lassen).
4. Mit einer Waschflasche mit mildem Strom Aqua dest. den Objektträger abspülen. Alternativ 2 x 5 min in einer Färbeküvette mit Aqua dest. waschen. Überschuß Waschflüssigkeit durch Abtupfen des Objektträgers mit einem sauberen Papierhandtuch entfernen und das Präparat an der Luft trocknen lassen.
5. Mit Eindeckmittel (1-2 Tropfen) ein Deckglas einbetten.
6. Jede Auftragstelle unter dem Fluoreszenzmikroskop zuerst mit einer Vergrößerung von 25 x 40 und dann mit 63 x 100 untersuchen, um die Morphologie der Bakterien zu identifizieren. Anmerkung: Der Objektträger muß sofort untersucht oder bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden; innerhalb von 24–48 Stunden ablesen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Alle Reagenzien sind nur für den in vitro Gebrauch.
2. Färbereagenz nicht direktem Tageslicht aussetzen.
3. Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Zimmertemperatur (20–25°C) erreicht haben. Nach Gebrauch sofort in den Kühlschrank stellen.
4. Vor Gebrauch Objektträger mit 95%igen Äthanol reinigen.
5. Schutzhandschuhe während des Tests benutzen.
6. Reagenzfläschchen vor Gebrauch schütteln.
7. Das Färbereagenz enthält Evan's-Blau, welches ein potentielles Karzinogen darstellt. Vermeide Hautkontakt. Sofort abwaschen, wenn man damit in Berührung gekommen ist.
8. Keine Kitkomponenten über das Verfallsdatum hinaus verwenden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Zeigen Präparate einzelne Bakterien oder Anhäufungen (variabel in der Größe) von apfelgrünen Coccobacilli oder von stäbchenförmigen Bakterien. Diese Färbung gilt als positiver Nachweis von *L. pneumophila*. Die Organismen müssen fluoreszieren und entsprechende morphologische Charakteristika ähnlich der der positiven Kontrolle aufweisen. Eine Probe, die orange bis rot gefärbte Organismen zeigt, gilt als negativ auf *L. pneumophila*. Bei Bakterien aus Nährbodenkolonien können die Fluoreszenzintensitäten variieren. Dies hängt von der Bakteriendichte, aber auch vom Alter der Kultur ab.

TESTBEGRENZUNGEN

1. Die Abwesenheit von *L. pneumophila* in einer klinischen Probe muß nicht die Existenz anderer *Legionella* Spezies ausschließen.
2. Einige Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* und einige wenige andere Bakterienspezies tragen Fc-Rezeptoren für IgG auf ihren Zellwänden. Diese weisen dann eine Fluoreszenz aufgrund einer unspezifischen Bindung von Gammaglobulinen an den Fc-Rezeptoren ihrer Zelloberfläche auf.
3. Die Anwesenheit von Leukozyten im Probenmaterial stört die Interpretation, da diese Zellen ebenfalls Fc-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche aufweisen.
4. Antibiotikabehandlung eines Patienten vor der Probenmaterialgewinnung zeigt sich in einer Änderung der morphologischen Struktur.

LITERATUR

1. McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W. et al., 1977. Legionnaire`s disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in another respiratory disease. N. Engl. J Med, 297, 1197-1203.
 2. Fraser, D.W., Deubner, D.C., Hill, D.L.; and Gilliam, D.K. 1979. Non pneumonic short-incubation period legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a steam turbine condenser. Science (Washington, D.C.) 205, 5690-5691
 3. Collins, M.T., Cho, S.N., Hoiby, N., et al., 1983. Crossed immunoelectrophoretic analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigens. Infect. Immun. 39, 1428-1440.
 4. Joly, J.R., and Kenny, G.E. 1982. Antigenic analysis of *Legionella pneumophila* and *Tatlockia midadei* (*Legionella midadei*) by two dimensional (crossed) immunoelectrophoresis. Infect. Immun. 35, 721-729.
 5. Guillet, J.G., Hoebeke, J., Tram, C., et al., 1983. Characterization, serological specificity and diagnostic possibilities of monoclonal antibodies against *Legionella pneumophila*. J Clin. Microbiol. 18, 793-797.
 6. Sethi, K.K., 1985. Monoclonal antibodies against *Legionella pneumophila* Serogroup 1 antigens: Characterization and their potential applications. p. 121-136. In A.J.L. Macario and Everly C. de Macario (ed.) Monoclonal antibodies against bacteria . Academic Press, Inc. New York, Vol. 1.
 7. Jolly, J.R.; Chen, Y.Y., and Ramsay, D. 1983. Serogrouping and subtyping of *Legionella pneumophila* with monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 18,1040-1046.
 8. Gostig, L.H., Cabrian, K., Starge, J.C. and Goldstein, L.C. 1984. Monoclonal antibody to a species specific antigen of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 20, 1031-1035.
- (01.07.2005)