

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIRESANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		



M-IDENT®-LEGIONELLA-LÁTEX

Método de látex para la detección de Legionella pneumophila serogrupos 1-15 previo cultivo selectivo

3ª generación: incluye Legionella spp.

Introducción:

Legionella pneumophila ha sido descrita como la principal causante tanto de la neumonía (Enfermedad del legionario) como de la fiebre de Pontiac. (1,2).

Las especies de *Legionella* sólo crecen en medios que contengan L-cisteína hidrocloreto y pirofosfato férrico (CYS+)(3). Aún en medios suplementados, la *Legionella* crece despacio (2-14 días), por lo que puede ser sobrepasada en el cultivo mixto por otras bacterias de crecimiento más rápido (4). El extracto de levadura con carbón vegetal (BCYE CYS-) suele usarse como medio básico, al que se le añaden varios suplementos según el uso sea clínico o ambiental (GVPC).

Los bacilos gram negativos que crecen en un medio BCYE CYS+ pero no en un BCYE CYS- son presumiblemente especies de *Legionella* (3). Sin embargo otros organismos pueden crecer en cualquiera de los dos medios y por tanto el BCYE CYS+ no es un medio completamente específico para el crecimiento de *Legionella*. Por tanto es necesario un test sensible y específico para la identificación rápida de los aislamientos de *Legionella*.

Fundamento del test:

M-Ident Legionella látex permite la identificación por separado de los serogrupos 1 y 2-15 de *L.pneumophila* y también de *Legionella spp.*, mediante 3 látex separados, uno para el serogrupo 1, otro para los serogrupos 2 al 15 (nótese que el serogrupo 15 es nuevo y también se incluye, y el 16 también porque teóricamente reacciona como el 6) y otro para *Legionella spp.*

Las células de *Legionella* tienen múltiples antígenos de superficie que provocan la formación de anticuerpos cuando células enteras son inyectadas en conejos. Los antígenos responsables de cada serogrupo se considera que son lipopolisacáridos, parecidos a los antígenos "O" de otros bacilos gram negativos.

El antisuero se hace específico al absorberlo con cepas que tienen reacciones cruzadas.

Las partículas de látex están sensibilizadas con estos anticuerpos de conejo producidos contra *L.pneumophila* serogrupo 1, con anticuerpos producidos contra *L.pneumophila* serogrupos 2-15 y con anticuerpos contra *Legionella spp.* Cuando estas partículas de látex se mezclan con una suspensión que contiene antígenos de *L.pneumophila*, o de *Legionella spp.*, se produce una reacción inmunoquímica que causa la aglutinación de las partículas de látex en agregados fácilmente visibles a simple vista. El reactivo de látex cubierto con anticuerpos del serogrupo 1 sólo aglutinará en presencia de antígenos del serogrupo 1, al igual que el reactivo de látex recubierto con anticuerpos de los serogrupos 2-15 sólo aglutinará con antígenos de uno de estos serogrupos y **el reactivo de látex recubierto con anticuerpos de *Legionella spp.* sólo aglutinará con antígenos de otras especies de *Legionella* que no son *L.pneumophila*, en concreto: *L.micdadei*, *L.bozemanii* 1, *L.bozemanii* 2, *L.dumoffi*, *L.longbeachae* 1, *L.longbeachae* 2, *L.jordanis*, *L.gormanii*, *L.anisa* y *L.feelei*. También pueden dar resultados positivos *L.sainthelensi* 1, *L.erythra*, *L.hacklaie* 1 y *L.tucsonensis*.**

Composición del kit:

Kit para 50 determinaciones (Referencia KMB301):

- ① Reactivo de látex 1: partículas de látex recubiertas de anticuerpos de *L.pneumophila* serogrupo 1. 0,099% azida como conservante: 2,5 ml. Tapón azul
- ① Reactivo de látex 2: partículas de látex recubiertas de anticuerpos de *L.pneumophila* serogrupos 2-15. 0,099% azida: 2,5 ml. Tapón amarillo.
- ① Reactivo de látex 3: partículas de látex recubiertas de anticuerpos de *L.spp.* 0,099% azida: 2,5 ml. Tapón rojo.
- ① Solución salina isotónica al 0,85%, conservada con 0,1% de azida sódica (para disolver colonias y como control negativo): 5 ml. Tapón blanco.
- ① Incluye control positivo de antígenos inactivados contra *L.pneumophila* serogrupos 1 -15 y *Legionella spp.* **Tapón negro.**
- ① Portaobjetos desechables
- ① Palillos desechables para mezclar.

Material necesario no suministrado:

- Agar selectivo de *Legionella* BCYE (MICROKIT DMT007+SBL604, RPL018+SBL604, PPL030, PPL908, PPL560)
- Tubos de vidrio para llevar a ebullición
- Membranas PREFERIBLEMENTE DE 0,2µm (VAC022)
- Botes tomamuestras 1 l estériles con Tiosulfato (DCPJC1N)
- Cepas (lentejas) para validar los reactivos una vez llegados a fábrica o tras almacenamientos prolongados o inadecuados.

- Participación en servicios intercomparativos como SEILAGUA para validar los procedimientos y los operarios

Otras referencias de productos MICROKIT para Legionella:

Placas 90 mm (PPL030), Frascos BCYE Agar + suplementos (RPL018+SBL604), Tubos Caldo Enriquecimiento (ó Presencia/Ausencia) + Torundas (RPL330), Plaquetas herméticas 55 mm MF (PPL908)

Conservación y estabilidad:

El kit debe guardarse en nevera de 4-8 °C. ¡No congelar! Los reactivos pueden usarse directamente de la nevera sin necesidad de atemperarlos. No usar el kit pasada la fecha de caducidad que aparece indicada en la caja (aprox. 1 año desde fabricación). No usar el kit si se ha contaminado con el uso o si el control positivo no reacciona correctamente, señal de almacenamientos inadecuados.

Observaciones:

1. Los reactivos suministrados en este equipo son para diagnóstico in vitro exclusivamente.
2. Los reactivos contienen azida sódica como conservante, que puede reaccionar con los utensilios de plomo y cobre formando azidas metálicas explosivas. Después de desechar cualquier líquido por las cañerías, dejar correr grandes cantidades de agua para prevenir la formación de azidas.
3. El kit debe usarse siguiendo las instrucciones de uso. No diluir ninguno de los reactivos. No mezclar reactivos de diferentes lotes. No congelar ninguno de los componentes del kit.
4. Observar con cuidado el tipo de aglutinación: reacciones con grumos o filamentos no son auténticas aglutinaciones.
5. Este kit ha sido diseñado para confirmar colonias sospechosas crecidas en medios selectivos para Legionella como el GVPC, que no crecen en medios sin cisteína.

Procedimiento de trabajo:

1-Control de los látex: Agitar y añadir una gota de cada uno de los 3 látex a sendos círculos de una tarjeta. Añadir en el lado opuesto de cada círculo sendas gotas de salina. Mezclar con sendos palillos, repartiendo por la totalidad de cada círculo. Balancear en vaivén 2 minutos y observar aglutinación: si aparece en alguno de los 3, el kit se ha contaminado de los anteriores usos y debe emplearse uno nuevo.

2-Control positivo: Agitar y añadir una gota de cada uno de los 3 látex a sendos círculos de una tarjeta. Añadir en el lado opuesto de cada círculo sendas gotas de control positivo. Mezclar con sendos palillos, repartiendo por la totalidad de cada círculo. Balancear en vaivén 2 minutos y observar aglutinación: si no aparece algún tipo de aglutinación en alguno de los 3, el kit se ha estropeado durante el transporte o almacenamiento y debe usarse uno nuevo.

3-Test: Añadir una gota de solución salina en 3 pocillos del portaobjetos. Mezclar las colonias sospechosas con la solución salina en sendos pocillos, hasta obtener una suspensión homogénea que se extienda por todo el círculo. Balancear 30 segundos. Si aparece autoaglutinación, repetir todo el proceso tras hervir otra suspensión colonial durante 5 minutos en un tubo *. Añadir una gota del látex 1 atemperado y agitado en el primer pocillo con suspensión no autoaglutinada de colonias. Añadir una gota del látex 2-15 atemperado y agitado en el segundo pocillo con suspensión no aglutinada de las colonias. Añadir una gota del látex de especies atemperado y agitado en el tercer pocillo con suspensión no aglutinada de las colonias. Precaución: Evitar que los goteros de látex toquen la suspensión bacteriana, si se contaminan quedarán inutilizados. Mezclar cada suspensión con un palillo diferente por toda la superficie de cada círculo. Balancear en vaivén durante **2 minutos**. Toda aglutinación en el pocillo 1, es de *Legionella pneumophila* serogrupo 1; toda aglutinación del pocillo 2, es de *Legionella pneumophila* serogrupos 2-15; toda aglutinación del pocillo 3, es *Legionella spp.* Si no aglutina ninguno, no hay *Legionella spp.* ni *Legionella pneumophila*; si aglutinan dos o tres pocillos, posiblemente hay aglutinación inespecífica, lo cual ni confirma ni descarta que se trate de *Legionella*.

Utilice como control positivo ADICIONAL una cepa de *Legionella pneumophila* (MICROKIT MKTN 12821) para confirmar que los reactivos le han llegado o se le mantienen operativos. Como control negativo utilice la solución salina sin colonias.

* Nota: Si el cultivo es viejo y/o mucoso es posible que no pueda obtenerse una suspensión homogénea tal y como se describe. En este caso preparar también una suspensión hervida tal como se detalla a continuación:

- a). Poner 0,5 ml de solución salina isotónica (0,85%) en un tubo. Preparar un suspensión homogénea y turbia de microorganismos con una colonia tomada de la placa de cultivo.
- b). Hervir la suspensión durante 5 minutos. Dejarla enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente. Poner 30 µl de la suspensión hervida en 3 pocillos de un porta provisto en el equipo.

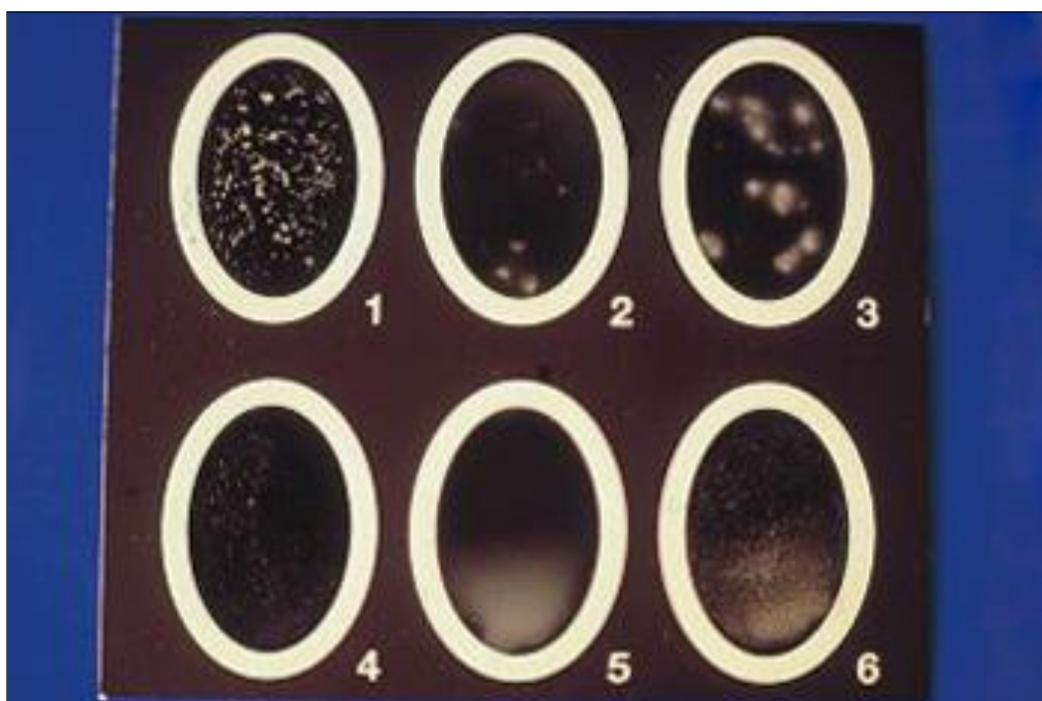
Interpretación:

Una reacción de aglutinación se produce cuando hay una agregación visible de las partículas de látex. Los resultados del kit M-Ident Legionella látex deben interpretarse de la siguiente manera:

<u>Reacción con</u> látex serogrupo 1	<u>Reacción con</u> látex serogrupo 2-15	<u>Reacción con</u> látex spp.	<u>Interpretación</u>
+	-	-	Presencia <i>L. pneumophila</i> 1
-	+	-	Presencia <i>L. pneumophila</i> 2-15
-	-	+	Presencia <i>L.spp.</i>
-	-	-	Ausencia de <i>Legionella</i> *
+	+	+	Posible aglutinación no específica
+	+	-	Posible aglutinación no específica
+	-	+	Posible aglutinación no específica
-	+	+	Posible aglutinación no específica

Una aglutinación no específica no excluye la presencia de *L. pneumophila*, de ambos grupos o no, ni de *Legionella spp.*, pero este resultado debe ser considerado como indeterminado.

* Alguna cepa de campo de *Legionella pneumophila* puede perder los antígenos aglutinantes, por lo que es mejor dar los resultados como dicta la Norma ISO11731: “No encontrada *L.pneumophila*” en vez de “Ausencia de *L.pneumophila*”



1, 4: Positivos, fuerte y suave (grumos sin fondo lechoso).
5, 6: Negativo (fondo lechoso, sin o con aglutinación).
2, 3: Negativo falsamente positivo (restos de colonias, pelusas, grumos difusos con aspecto lechoso).

Referencias:

El estudio inicial de validación del kit, en Febrero de 1988, demostró que de 334 cepas analizadas de *Legionella pneumophila*, la técnica DFA

detectó 295, la caracterización genética 334 y Microkit-Legionella 334 (258 del grupo 1 y 76 del 2-14).

Según Medical Lab.Science (1992) 49, 144-146, de 79 cepas de *L.pneumophila* y de 13 de Legionella sp. analizadas, todas fueron correctamente identificadas con Microkit-Legionella, excepto las del serogrupo 12, que mostraron reacciones cruzadas con el reactivo para el serogrupo 1. Este defecto fué corregido en 1993. Ninguna de las 13 cepas de Legionella no pneumophila reaccionó con los reactivos del kit.

La revalidación del nuevo kit demostró, en una población de 128 aislados, una sensibilidad del 100%, una especificidad del 100% y una eficiencia del 100%. La reproducibilidad intra-lote ha sido testada con 47 muestras y 3 analistas diferentes, obteniéndose resultados idénticos. La reproducibilidad inter-lote ha sido examinada con 3 lotes diferentes en 47 muestras: no existían diferencias significativas entre los 3 lotes.

Bibliografía:

- Fraser, DW., and J.E. McDade 1979. Legionellosis. Sci. Am. 241:82 99
- Kaufmann A.F., J.E. McDade, C.M. Patton, J V. Bennett, P. Skaliy, J.C. Feeley, D.C. Anderson, M.E. Potter, V.F. Newhouse, M.B. Gregg, and P.S. Brachman. 1981. Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode transmission Am. J. Epidemiol. 114:337-347.
- Feeley, J.C., R.J. Gibson, G.W. Gorman, N.C. Langford, J.K. Rasheed, D.C. Mackel, and W.B. Baine 1979. Charcoal yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila* J. Clin. Microbiol. 10:437 441.
- Edelstein, P.H. 1983 Culture diagnosis of Legionella infections. Zbl.Bakt.Hyg. 1 Abt. Orig.A 255:96-101.
- Edelstein, P.H. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J.Clin. Microbiol. 14:298-303.
- Bopp L.A. Sumner J.W., Morris G.K., Wells J.G. (1981) J.Clin. Micro., 13,714-719.
- Vickers R.M., Brown A., Garrity G.M.. (1981) J.Clin. Micro. 13, 380-382.
- Renner E.D., Tseng C.H., (1982) Clin Microbiol Newsletter. 4, 139-142.

¡NOTA: TODA AGLUTINACIÓN CON FONDO LECHOSO DEBE INTERPRETARSE COMO NEGATIVA (LAS COLONIAS MUCOSAS O CARTILAGINOSAS FORMAN GRUMOS, PERO ESO NO ES AGLUTINACIÓN)!

Ver también el inmunocromatograma VIRAPID-Legionella, con las mismas prestaciones que el látex, pero mejor robustez, y sin necesidad de mantenimiento en refrigeración

El usuario final es el único responsable de la destrucción de los microorganismos, de acuerdo con la legislación medioambiental vigente. Desinfectar o autoclavar los palillos y tarjetas utilizados antes de desechar a la basura.