



## ISTRUZIONI PER L'USO

**LEGIONELLA RAPID LATEX TEST**TEST DI AGGLUTINAZIONE AL LATTICE SU SLIDE PER L'IDENTIFICAZIONE CONFERMATIVA DI PRESUNTE COLONIE DI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* E *LEGIONELLA SPP***1 – INTRODUZIONE**

Legionella Rapid Latex Test è un test di agglutinazione al lattice destinato all'identificazione confermativa di *Legionella pneumophila* e delle specie di *Legionella* comunemente isolate, coltivate su terreni selettivi. Il test è adatto a campioni provenienti da fonti ambientali. Legionella Rapid Latex Test consente l'identificazione separata di *L. pneumophila* sierogruppo 1 e sierogruppi 2-15\* e delle specie di *Legionella* comunemente isolate.

\*Nota: Il sierogruppo 16 di *L. pneumophila* è ora menzionato nel Manuale di microbiologia clinica. Il sierogruppo 16 dovrebbe reagire in modo incrociato con il sierogruppo 6, quindi teoricamente il reagente al lattice Mascia Brunelli 2-15 dovrebbe agglutinare anche con gli isolati del sierogruppo 16.

Il kit è destinato esclusivamente all'uso professionale, alla diagnostica industriale e non ai test clinici.

**2 – PRINCIPIO DEL METODO**

Il reattivo REAG TEST L1 contiene particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi policlonali di coniglio anti-*Legionella pneumophila* sierogruppo 1.

Il reattivo REAG TEST L2-15 contiene particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi policlonali di coniglio anti-*Legionella pneumophila* sierogruppi dal 2 al 15.

Il reattivo REAG TEST LSPP contiene particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi policlonali di coniglio rivolti verso gli antigeni di 10 specie di *Legionella* più comunemente isolate dai campioni clinici o ambientali: *L. micdadei*, *L. bozemanii* 1 & 2, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* 1 & 2, *L. jordanis*, *L. anisa*, *L. feelei*.

Quando le particelle di lattice vengono mescolate con una sospensione contenente batteri di *Legionella* o antigeni uccisi a caldo provenienti da batteri di *Legionella* in questione, avviene una reazione immunochimica che provoca l'agglutinazione delle particelle di lattice in aggregati facilmente visibili a occhio nudo. Il reagente al lattice rivestito con anticorpi del sierogruppo 1 si agglutina solo in presenza di antigeni del sierogruppo 1. Il reagente al lattice rivestito con anticorpi del sierogruppo 2-15 agglutinerà solo in presenza di antigeni di uno qualsiasi dei sierogruppi 2-15. Il reagente al lattice rivestito con anticorpi contro le specie di *Legionella* agglutinerà con le 10 specie di *Legionella* indicate sopra.

Generalmente le reazioni del reagente 1 con gli antigeni del sierogruppo 1 sono più forti e più rapide di quelle tra il reagente 2-15 e gli antigeni del sierogruppo 2-15. Ciò è dovuto all'effetto di diluizione della miscela di 15 antisieri diversi durante la produzione del reagente 2-15. Il lattice della specie *Legionella* reagisce in modo simile al lattice del sierogruppo 1 di *Legionella pneumophila*.

**3 – MATERIALI FORNITI – CONFEZIONAMENTO**

Prodotto	Tipologia	REF	Confezione
LEGIONELLA RAPID LATEX TEST	Test di agglutinazione al lattice	271050U (50 test)	1 vial di vetro con particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi policlonali di coniglio anti- <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 1 (REAG TEST L1). Contiene sodio azide come conservante allo 0,33% (2,5 mL = 50 test – tappo blu) 1 vial di vetro con particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi policlonali di coniglio anti- <i>Legionella pneumophila</i> sierogruppo 2-15 (REAG TEST L2-15). Contiene sodio azide come conservante allo 0,33% (2,5 mL = 50 test – tappo giallo) 1 vial di vetro con particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi policlonali di coniglio rivolti verso gli antigeni di 10 specie di <i>Legionella</i> (indicate sopra). (REAG TEST LSPP). Contiene sodio azide come conservante allo 0,33% (2,5 mL = 50 test – tappo rosso) 1 vial di vetro con Controllo Positivo (CONTROL +): preparazione inattivata di antigeni di <i>Legionella</i> reattivi con i reagenti al lattice REAG TEST L1, REAG TEST L2-15 e REAG TEST LSPP. Contiene sodio azide allo 0,33% come conservante. (1.0 mL – tappo nero) 2 vial di vetro SAMPLE DILUENT, soluzione salina isotonica. Contiene Sodio Azide 0.33% come conservante. (2x5.0mL - tappo bianco) Slide a 6 aree test: cartoncino idrorepellente (25 pezzi) Bacchette: bacchette in plastica per miscelazione (1x25: 3 pezzi) Imballo secondario: scatola di cartone.

**4 – MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

Anse da batteriologia. Terreno selettivo per *Legionella*. Provette di vetro adatte alla bollitura. Soluzione salina isotonica 0,85%.

**5 – PRECAUZIONI E AVVERTENZE**

- LEGIONELLA RAPID LATEX TEST è un kit per il solo uso professionale; solo per la diagnostica industriale e non per effettuare test clinici.
- Il controllo positivo è stato inattivato durante il processo produttivo. In ogni caso deve essere maneggiato come se fosse potenzialmente infetto.
- La sodio azide, utilizzata come conservante nei reagenti del kit, può reagire con le tubature in piombo o in rame formando sali metallici potenzialmente esplosivi. Smaltire sciacquando abbondantemente con acqua per evitare l'accumulo di azidi.





- Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Prendere le necessarie precauzioni quando si maneggiano o si smaltiscono ceppi potenzialmente patogeni. Per la decontaminazione del materiale infetto utilizzare ipoclorito di sodio a una concentrazione finale del 3% per 30 minuti. Gli scarti liquidi contenenti acido devono essere neutralizzati prima di eliminarli.
- La sensibilità del test potrebbe essere ridotta a basse temperature. Portare i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F) prima dell'uso.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza e non usare il test se la confezione è danneggiata. La qualità dei reagenti non può essere garantita oltre la data di scadenza o se il kit è conservato in condizioni non appropriate.
- Non diluire i reagenti del kit.
- Fare in modo che il contagocce del reagente al lattice non tocchi il controllo positivo o il campione batterico.
- Tutte le operazioni riferite all'esecuzione del test devono essere condotte in accordo alle Buone Pratiche di Laboratorio ed in conformità alle Istruzioni del kit.
- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
- Fare attenzione a registrare solo l'agglutinazione. Le reazioni "coagulate" o "filamentose" possono non essere vere agglutinazioni.
- Il Certificato di Analisi e la Scheda Dati di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito web: [www.masciabrunelli.it](http://www.masciabrunelli.it).
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

#### 6 – CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA

I reattivi e i controlli devono essere conservati a +2°C - +8°C ben chiusi e prevenendo la loro contaminazione durante il loro utilizzo. Non congelare i reagenti. In queste condizioni i componenti rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata nell'etichetta.

#### 7 – CAMPIONE

Il campione consiste in presunte colonie di *Legionella* isolate da piastre di terreno selettivo. La morfologia delle colonie analizzate deve assomigliare a quella della *Legionella*. **Le colonie devono avere almeno 3 giorni di vita.**

#### 8 – PROCEDIMENTO DEL TEST

**Lasciare che i componenti del kit raggiungano la temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F) prima del test.**

##### Controllo di Qualità

Ogni volta che si utilizza il kit è necessario effettuare i seguenti controlli.

1. **Controllo del reagente:** miscelare gentilmente i reattivi REAG TEST L1, REAG TEST L2-15 e REAG TEST LSPP e depositarne una goccia in tre distinte aree dello slide. Aggiungere a ciascuna goccia di reattivi al lattice una goccia di SAMPLE DILUENT nelle stesse aree dello slide. Miscelare i reattivi al lattice con il Sample Diluent su tutte le superfici delle aree dello slide, con tre differenti bastoncini. Ruotare delicatamente lo slide per 2 minuti e osservare per il formarsi di agglutinati. Se si osserva una qualche agglutinazione o il lattice o la soluzione salina sono contaminati e devono essere scartati.
2. **Controllo Positivo:** aggiungere una goccia di reagente CONTROL + su un'area dello slide. Aggiungere una goccia di lattice REAG TEST L1 alla stessa area e miscelare. Fare in modo che il contagocce non tocchi il controllo positivo. Ruotare delicatamente lo slide. Entro 2 minuti si deve vedere l'agglutinazione, indice di risultato positivo. Ripetere la stessa prova di controllo con i reattivi **REAG TEST L2-15 e REAG TEST LSPP**. Se non si osserva agglutinazione è necessario usare un nuovo kit.

Nota: l'intensità della reazione con il controllo positivo può non essere la stessa per il REGAT TEST L1 e per il REAG TEST L2-15 e il REAG TEST LSPP (vedere il paragrafo PRINCIPIO DEL METODO).

##### Procedura del test

1. Dispensare 1 goccia di **SAMPLE DILUENT** su tre differenti aree dello slide.
2. Utilizzando un'ansa da batteriologia, rimuovere 3-4 colonie con morfologia tipica di *Legionella* dalla piastra di terreno selettivo ed eseguire uno striscio spesso e uniforme a fianco di ciascuna goccia di SAMPLE DILUENT.
3. Con l'ausilio di un bastoncino, emulsionare le colonie nella goccia di SAMPLE DILUENT per produrre una sospensione densa e omogenea su tutta l'area dello slide.
4. Se la sospensione rimane omogenea passare alle operazioni del punto 7; se la sospensione diventa filamentosa e granulosa (spesso quando le colonie sono mucoidi) procedere come segue:
5. Dispensare in una provetta 0,5 mL di soluzione salina isotonica allo 0,85%. Preparare una sospensione microbica torbida ed omogenea prelevando la crescita microbica dalla piastra di terreno selettivo.
6. Bollire la sospensione per 5 minuti. Lasciare raffreddare a temperatura ambiente. Deposare tre aliquote da 30µL della sospensione bollita su tre aree dello slide.
7. Miscelare i reattivi al lattice **REAG TEST L1, REAG TEST L2-15, REAG TEST LSPP** capovolgendo delicatamente i flaconcini.
8. Depositare una goccia di **REAG TEST L1** accanto alla prima sospensione batterica, una goccia di **REAG TEST L2-15** accanto alla seconda sospensione batterica ed una goccia di **REAG TEST LSPP** accanto alla terza sospensione. Fare in modo che i contagocce non tocchino le sospensioni.
9. Miscelare i reagenti al lattice con le sospensioni batteriche su tutta l'area della card, usando ogni volta un nuovo bastoncino monouso.
10. Ruotare delicatamente lo slide per 2 minuti ed osservare per la formazione di agglutinati.





11. Dopo la lettura, eliminare i bastoncini e le slide usati in un disinfettante adatto.

**9 – LETTURA , INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

La reazione di agglutinazione è evidenziabile con l'aggregazione delle particelle di lattice entro 2 minuti. I risultati devono essere interpretati secondo i criteri riportati in tabella:

REAG TEST L1	REAG L2-15	REAG LSPP	Interpretazione
+	-	-	Presenza di <i>L. pneumophila</i> 1
-	+	-	Presenza di <i>L. pneumophila</i> 2-15
-	-	+	Presenza di <i>Legionella</i> specie
-	-	-	Assenza di agglutinazione, risultato inconcludente*
+	+	+	Possibile agglutinazione aspecifica Risultato inconcludente**
+	+	-	Possibile agglutinazione aspecifica Risultato inconcludente**
+	-	+	Possibile agglutinazione aspecifica Risultato inconcludente**
-	+	+	Possibile agglutinazione aspecifica Risultato inconcludente**

\* La mancanza di agglutinazione per presunte colonie di *Legionella* cresciute su un terreno selettivo non preclude la presenza di batteri di *Legionella*, tuttavia i risultati devono essere interpretati come non concludenti. Il test deve essere ripetuto con 3-4 colonie in più, per avere una quantità di cellule superiore. Per ottenere una massa cellulare più elevata sulla piastra di agar selettivo e per aumentare l'espressione degli epitopi rilevati dai reagenti al lattice, il tempo di incubazione può essere prolungato di altre 24 ore.

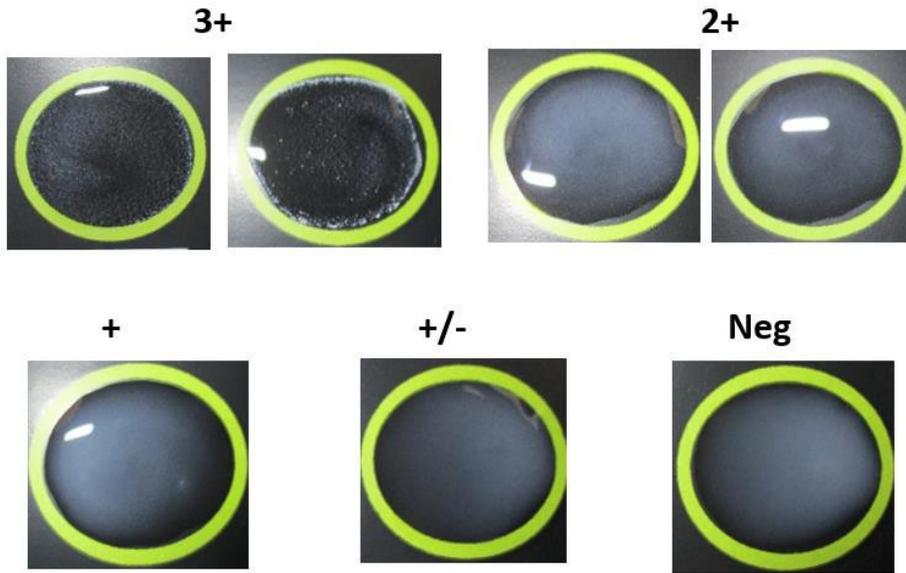
\*\* Un'agglutinazione non specifica non preclude la presenza di batteri di *Legionella*, ma i risultati devono essere interpretati come non concludenti. Il test deve essere ripetuto con altre 3-4 colonie presuntive, utilizzando una massa cellulare leggermente ridotta per diminuire la reattività incrociata causata dal sovraccarico di biomassa.

Intensità di reazione	Descrizione
3+	Particelle grandi e agglutinate, che possono formare un anello di precipitazione bianca. Lo sfondo è limpido.
2+	Agglutinazione visibile, ma con sfondo lattiginoso.
+	Agglutinazione fine in cui le particelle sono visibili solo quando si oscilla. Lo sfondo appare lattiginoso.
Tracce (+/-)	Agglutinazione molto fine visibile solo quando si oscilla con uno sfondo lattiginoso. Una via di mezzo tra una reazione + e una reazione negativa.
Negativo (-)	Nessuna agglutinazione, appare come un liquido lattiginoso.





Figura 1 – Esempi di intensità di reazione



**10 – LIMITI DEL METODO**

- I risultati devono essere interpretati nel contesto di tutte le informazioni di laboratorio disponibili.
- La presenza di reazioni “filamentose” sullo slide possono non essere vere reazioni positive e sono necessari ulteriori test.
- Le colture vecchie e/o mucoidi di *Legionella* possono non dare sospensioni omogenee in soluzione salina e possono dar luogo ad agglutinazioni atipiche. In questi casi, pre-trattare con la bollitura come descritto in precedenza.
- Legionella Rapid Latex Test è un kit indicato per l’identificazione dei sierotipi 1-15 di *L. pneumophila* e di *Legionella spp.*, dopo isolamento su terreno selettivo e dopo essere confermate come appartenenti al genere *Legionella* per mezzo del test di incapacità a crescere su terreno di coltura privo di cisteina.
- I terreni di coltura di produttori diversi possono provocare una lenta espressione dell'antigene. Gli utenti dovrebbero testare i loro terreni con ceppi noti per assicurarsi che il test funzioni come previsto prima di testare isolati sconosciuti.
- I componenti di questo prodotto sono sempre stati testati tra loro senza verificarne la compatibilità con componenti prodotti da altri fabbricanti. Pur non escludendo la possibilità che i componenti in questione possano essere usati con componenti di medesima formulazione ma prodotti da altre Aziende, non si ha un’evidenza sperimentale di tale compatibilità.

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

	Limiti di temperatura	<b>LOT</b>	Codice del lotto (DXXX)		Tenere lontano dal calore		Fabbricante		Mantenere asciutto
	Consultare le istruzioni per l’uso		Utilizzare entro (anno/mese)	<b>REF</b>	Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.