

# PathoDx

## Chlamydia Culture Confirmation Kit

**REF** R62210

**IT**

### 1. FINALITÀ D'USO

Il Chlamydia Culture Confirmation Kit PathoDx™ è un test di immunofluorescenza previsto per il rilevamento e l'identificazione del genere *Chlamydia* dopo la crescita nella coltura del tessuto.

### 2. RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Le Chlamydiae sono i più comuni agenti eziologici nelle malattie trasmesse per via sessuale.<sup>15</sup> Le Chlamydiae sono microrganismi intracellulari immobili e obbligati, con pareti cellulari simili a quelle dei batteri gram-negativi.<sup>12,13</sup> Il genere *Chlamydia* è suddiviso in tre specie: *C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae*, tutte sembrano condividere un antigene lipopolisaccaride comune (LPS).<sup>18</sup>

*C. trachomatis* è responsabile di infezioni gravi e spesso asintomatiche negli esseri umani.<sup>7</sup> È attualmente riconosciuta come causa di cervicite e di malattie infiammatorie pelviche (PID) nelle donne,<sup>3,4,16</sup> uretrite nongonococcica e epididimite nei maschi,<sup>2,8,12</sup> congiuntivite da inclusione e polmonite nei neonati.<sup>1,3,5</sup> *C. psittaci* è principalmente un agente patogeno animale, ma può causare infezioni negli esseri umani, di solito come risultato di esposizione a specie aviarie infette. *C. pneumoniae* è una delle specie descritte recentemente come responsabile di infezioni respiratorie acute, compresa la polmonite.

Le Chlamydiae vengono propagate nella coltura del tessuto usando un trattamento chimico di colture cellulari per accrescere la suscettibilità delle cellule ospiti contro l'infezione.<sup>14</sup> Attualmente sono disponibili numerose procedure diagnostiche per il rilevamento di *C. trachomatis* nei campioni clinici. È possibile che i saggi immunoenzimatici e i test di immunofluorescenza rilevino gli antigeni della Chlamydia direttamente da campioni clinici. Le colture cellulari infettate da Chlamydia possono essere colorate con iodio, Giemsa o anticorpi coniugati con fluoresceina.<sup>12-14</sup>

Le Chlamydiae sono presenti in due forme: un tipo cellulare infettivo, denominato corpo elementare e un tipo cellulare non infettivo riproduttivo, noto come corpo reticolato. Il ciclo di crescita della Chlamydia comincia con il collegamento e l'inserimento di corpi elementari nel citoplasma delle cellule ospiti. I corpi elementari quindi subiscono mutamenti morfologici allo scopo di formare corpi reticolati non infettivi, che si dividono con la fissione binaria, causando la formazione di inclusioni.<sup>6,14</sup> I corpi reticolati continuano a condensarsi e a riorganizzarsi, formando infine corpi elementari che vengono rilasciati da lisi cellulare.<sup>10,12,13</sup>

### 3. PRINCIPIO DEL METODO

Il Chlamydia Culture Confirmation Kit PathoDx utilizza anticorpi monoclonali murini coniugati con fluoresceina per eseguire la colorazione delle inclusioni e/o corpi elementari nei monostrati cellulari di 48 ore dopo l'inoculazione di un campione clinico. Gli anticorpi monoclonali coniugati con fluoresceina individuano sia la proteina principale della membrana esterna (MOMP) di tutti i

sierotipi di *C. trachomatis* che il lipopolisaccaride (LPS) specifico del genere di *Chlamydia*.

Quando il coniugato dell'anticorpo viene aggiunto a un copri oggetto contenente cellule di coltura del tessuto fissate in etanolo, il reagente si legherà specificamente a qualunque inclusione della Chlamydia presente nelle cellule. La fase di lavaggio rimuove il coniugato dell'anticorpo non legato. Quando il copri oggetto colorato viene visualizzato in un microscopio a fluorescenza, si osservano grandi inclusioni verde mela brillanti all'interno di cellule infette, contro uno sfondo di cellule contro-colorate di rosso.

### 4. REAGENTI

#### COMPONENTI DEL KIT

Chlamydia Culture Confirmation Kit	100 test (R62210)
1. Reagente di conferma per Chlamydia	1 boccetta contagocce (cappuccio turchese)
2. Liquido di montaggio (R62230)	1 boccetta contagocce (cappuccio nero)
3. Istruzioni per l'uso	1

#### DESCRIZIONE, PREPARAZIONE PER L'USO E RACCOMANDAZIONI PER LA CONSERVAZIONE

Fare riferimento anche alla sezione **Avvertenze e precauzioni di impiego**.



Conservare a 2-8°C. Usare entro la data di scadenza riportata sull'etichetta. Prima dell'uso, portare il reagente a temperatura ambiente (15-28°C) e miscelare accuratamente capovolgendo delicatamente la fiala. Gli anticorpi monoclonali vengono forniti pronti per l'uso; non sono necessarie ulteriori diluizioni.

#### CONFIRMATION

#### Reagente di conferma per Chlamydia

Una boccetta contagocce in plastica contenente 5,5 ml di anticorpi monoclonali di topo purificati coniugati con fluoresceina, colorante di contrasto blu di Evans, un inibitore dalla colorazione non specifica e lo 0,098% di sodio azide in una soluzione tampone resa stabile dalla proteina.

#### MOUNTING FLUID

#### Liquido di montaggio

Una boccetta contagocce in plastica contenente 5,0 ml di liquido di montaggio, composto da glicerolo tamponato contenente sodio azide allo 0,01% come conservante.

### 5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI DI IMPIEGO

#### IVD

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

Esclusivamente per uso professionale.

Per informazioni su componenti potenzialmente pericolosi, fare riferimento ai prospetti informativi sulla sicurezza forniti dal produttore e alle informazioni riportate sulle etichette dei prodotti.

#### PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Ai reagenti, come agente antibatterico, è stata aggiunta la sodio azide a una concentrazione inferiore allo 0,1%. Per evitare la formazione di azidi di metallo esplosive a contatto

con tubazioni in piombo o rame, i reagenti possono essere gettati nella rete fognaria solo se diluiti e irrigati con grandi volumi di acqua. Usare impianti di scarico privi di rame e piombo laddove possibile.

- Campioni clinici:** è necessario attenersi alle precauzioni di sicurezza durante la manipolazione e il trattamento di tutti i campioni clinici, poiché possono essere presenti organismi patogeni. È necessario seguire buone pratiche di laboratorio durante la manipolazione di colture sospette contenenti virus infettivi.
- Rifiuti:** sterilizzare tutti i rifiuti prima dello smaltimento, in conformità con le procedure di laboratorio standard e le normative locali.
- Nel Reagente è presente il colorante blu di Evans. Sebbene la concentrazione presente sia inferiore alla percentuale necessaria affinché il prodotto sia classificato come cancerogeno, è necessario evitare il contatto con la pelle.

#### PRECAUZIONI ANALITICHE

Questo prodotto non deve essere usato se (1) il colore si è modificato, (2) è trascorsa la data di scadenza, o (3) sono presenti altri segni di deterioramento.

### 6. PRELIEVO, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI

#### Prelievo e coltura dei campioni

Prelevare i campioni paziente in modo adeguato nel punto anatomico infetto, posizzarli nell'adeguato terreno di trasporto e inviarli al laboratorio per l'analisi. È necessario che il terreno di trasporto non impedisca la crescita di *Chlamydia* spp. o di cellule in coltura. Inoculare un monostrato di cellule McCoy o HeLa 229 con il campione paziente nel modo stabilito.<sup>6,9,11,14</sup> È possibile eseguire la colorazione entro 48 ore dopo l'inoculo.

Oltre a ciascun gruppo di campioni paziente, si consiglia di trattare come controlli positivi e negativi sia le cellule coltivate notoriamente infette che quelle notoriamente non infette da *Chlamydia*.

È possibile conservare i campioni a 2-8°C fino a 24 ore dopo il prelievo con una perdita minima di infettività. Per ottenere risultati migliori, si consiglia di trattare immediatamente i campioni. Sono necessarie temperature pari a -70°C o inferiori se la conservazione supera le 24 ore. Durante il trasporto, mantenere il campione alla stessa temperatura usata per la conservazione.

### 7. PROCEDURA

#### MATERIALE FORNITO

Il Chlamydia Culture Confirmation Kit (R62210) contiene materiale sufficiente per 100 test (fare riferimento a **Componenti del kit**).

#### MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Microscopio a fluorescenza con il sistema di filtraggio adeguato per isotocianato di fluoresceina (lunghezza d'onda massima per eccitazione = 490 nm; emissione massima = 520 nm; obiettivi in grado di raggiungere un ingrandimento di 100 e da 400 a 500)
- Acqua demineralizzata o 0,05 M di PBS
- Tamponi grandi in cotone o in poliestere (per pulire la porzione vaginale del collo dell'utero)
- Tamponi sterili per prelievo (non impediscono la crescita di *Chlamydia* spp.)
- Terreno di trasporto di Chlamydia

- Terreno di isolamento di Chlamydia contenente cicloesimide
- Fiale "Shell vial" (vetrino; 1 dracma)
- Cellule McCoy o HeLa 229 per campioni paziente e anche per controlli positivi e negativi (consigliati)
- Centrifuga
- Etanolo al 95% (di qualità reagente)
- Pinze
- Vetrini per microscopio
- Copri oggetto (diametro da 12 mm)
- Carta assorbente per asciugare i vetrini
- Beaker o vaschetta Coplin (per risciacquare i copri oggetto)
- Incubatore (37°C)
- Camera di umidificazione

#### PROCEDURA DEL TEST

Fissaggio	
<b>Fase 1</b>	Rimuovere il terreno di trasporto dalle fiale inoculate e aggiungere immediatamente una quantità sufficiente di etanolo al 95% per coprire completamente il monostrato. Lasciare riposare da 1 a 10 minuti.
<b>Fase 2</b>	Aspirare l'etanolo e rimuovere i copri oggetto con le pinze. Toccare il bordo del copri oggetto sulla carta assorbente per rimuovere l'etanolo in eccesso.
<b>Fase 3</b>	Posizionare il copri oggetto, il lato con cellule rivolto verso l'alto, su un vetrino per microscopio pulito ed etichettato. È necessario eseguire la colorazione dei copri oggetto entro 24 ore. Se non è possibile eseguire la colorazione in questo intervallo di tempo, conservare il copri oggetto nella "shell vial" con etanolo a -70°C.
<b>Colorazione</b>	
È necessario che i monostrati cellulari rimangano umidi durante tutte le fasi del procedimento. Il Reagente di conferma per Chlamydia deve trovarsi a temperatura ambiente (15-28°C) prima dell'uso. Miscelare accuratamente il Reagente di conferma per Chlamydia prima dell'uso, capovolgendo <i>delicatamente</i> la fiala.	
<b>Fase 1</b>	Aggiungere <b>una goccia</b> di Reagente di conferma per Chlamydia alle cellule fissate. <b>Non aggiungere il reagente a un monostrato completamente asciutto;</b> tenere sempre umide le cellule con PBS o acqua demineralizzata prima di aggiungere il reagente per garantire una copertura completa del monostrato.
<b>Fase 2</b>	Posizionare i vetrini in una camera umidificata e incubarli per <b>30 minuti a 37°C</b> . Non lasciare asciugare l'anticorpo sul copri oggetto, poiché l'asciugatura genererà una colorazione non specifica.
<b>Fase 3</b>	Facendo uso di pinze, sciacquare accuratamente i copri oggetto agitandoli per un tempo della durata da 10 a 15 secondi in un beaker o in una vaschetta Coplin riempiti con acqua demineralizzata o PBS. Toccare il bordo del copri oggetto con carta assorbente per rimuovere l'umidità in eccesso.
<b>Fase 4</b>	Aggiungere <b>una goccia</b> di liquido di montaggio a un vetrino per microscopio pulito. Capovolgere il copri oggetto e posizzarlo, tenendo il lato con cellule rivolto verso il basso, sopra il liquido di montaggio. Rimuovere eventuali bolle d'aria.

**Fase 5** Dopo aver eseguito la colorazione, esaminare i vetrini con un microscopio a fluorescenza. Eseguire la scansione dei monostrati con ingrandimento di 100 e verificare la morfologia con un ingrandimento che va da 400 a 500. Se è necessario ritardare la lettura, conservare i vetrini al buio dopo averli montati a 2-8°C. Per ottenere migliori risultati, è necessario leggere i vetrini entro 24 ore. Da notare che i vetrini colorati con coniugati di fluoresceina si scoloriranno se esposti alla luce. Prima della lettura, portare i vetrini a temperatura ambiente.

**Procedura di colorazione opzionale di copri oggetto nelle "Shell Vial"**

**Fase 1** Seguire la fase 1 della procedura di fissaggio nel modo descritto di seguito. Dopo 10 minuti, aspirare l'etanolo.

**Fase 2** Aggiungere una quantità di Reagente di conferma per Chlamidia sufficiente (circa 3-4 gocce) per coprire il copri oggetto. Richiudere la "shell vial" e incubarla per 30 minuti a 37°C.

**Fase 3** Lavare due volte il copri oggetto con acqua demineralizzata o distillata oppure 0,05 M di PBS.

**Fase 4** Aggiungere una goccia di liquido di montaggio a un vetrino per microscopio pulito. Con le pinze, rimuovere il copri oggetto dalla "shell vial". Toccare il bordo del copri oggetto con carta assorbente per rimuovere l'umidità in eccesso e posizionare il copri oggetto, tenendo il lato con cellule rivolto verso il basso, sopra il liquido di montaggio.

**Fase 5** Seguire la fase 5 della **procedura di colorazione**, come descritto di seguito.

**8. CONTROLLO DI QUALITÀ**

Oltre a ciascun gruppo di campioni paziente, si consiglia di trattare come controlli positivi e negativi sia le cellule coltivate notoriamente infette che quelle notoriamente non infette da *Chlamydia*, allo scopo di verificare le prestazioni del microscopio, del sistema per coltura e dei reagenti. I risultati dei test sono accettabili solo se le cellule coltivate infette da *Chlamydia* contengono corpi di inclusione che sono verde brillante fluorescente contro un monostrato cellulare contro-colorato di rosso scuro e cellule non infette che non hanno corpi di inclusione verde brillante.

**9. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

**Risultati positivi**

Le colture colorate e fissate che siano positive per le Chlamydiae contengono corpi di inclusione che diventano verde brillante fluorescente contro un monostrato cellulare contro-colorato di rosso scuro. La dimensione dei corpi di inclusione varierà a seconda delle condizioni della coltura e della classificazione del sierotipo. La presenza di un corpo di inclusione viene considerata *positiva*.

Nella letteratura sono disponibili esempi di inclusioni di Chlamydiae colorate con fluoresceina.<sup>17</sup> Tuttavia diversi anticorpi monoclonali coniugati con fluoresceina possono presentare un pattern di fluorescenza diverso.

**Risultati negativi**

Le colture fissate vengono considerate *negative* quando non sono presenti corpi di inclusione verde brillante nei monostrati cellulari contro-colorati di rosso scuro.

**10. LIMITAZIONI**

1. Il rilevamento di Chlamydiae in campioni coltivati dipende da un adeguato prelievo dei campioni, dal loro trasporto, dalla tecnica di coltura del tessuto e dalla preparazione del vetrino.
2. Il Chlamydia Culture Confirmation Kit PathoDx è previsto per il rilevamento e l'identificazione di *Chlamydia* esclusivamente in coltura di tessuto.
3. Non è disponibile alcun dato relativo alle prestazioni del Chlamydia Culture Confirmation Kit PathoDx nei campioni paziente prelevati durante o dopo un trattamento antibiotico.
4. I monostrati cellulari devono rimanere umidi durante tutte le fasi della procedura di verifica della coltura.
5. Il reagente attivo (Reagente di conferma per Chlamidia) è pronto per l'uso e ottimizzato per il rilevamento delle specie di *Chlamydia* note. La diluizione o altre alterazioni del reagente attivo possono provocare la perdita della sensibilità.
6. Questo test non differenzia fra le specie *Chlamydia* e nemmeno fra i sierotipi *Chlamydia trachomatis*.

**11. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE**

**Studi clinici**

Studi clinici sono stati condotti in due laboratori indipendenti allo scopo di confrontare le prestazioni del Chlamydia Culture Confirmation Kit PathoDx con quelle del test MicroTrak® C. *trachomatis* Culture Confirmation. Ciascun centro di indagine ha analizzato dei campioni clinici precedentemente non diagnosticati, che sono stati coltivati nei monostrati cellulari di McCoy a 35°C. Quindi i monostrati sono stati fissati, colorati ed esaminati in conformità con le procedure fornite nei rispettivi fogli illustrativi PathoDx e MicroTrak®.

Sono stati analizzati un totale di 250 campioni clinici. Nel centro numero uno sono stati prelevati 87 campioni per tampone cervicale e 13 per tampone uretrale da 100 adolescenti sessualmente attivi di un'età che va dai 12 ai 20 anni. Fra questi 100 adolescenti, la prevalenza di infezioni da Chlamydia è stata del 24%. Nel sito numero due sono stati prelevati 98 campioni per tampone cervicale e 52 per tampone uretrale da adulti. Fra questi 150 adulti, la prevalenza di infezioni da Chlamydia è stata del 39%. I risultati combinati dai due siti vengono forniti di seguito.

In generale, il test PathoDx è stato sensibile al 100% e specifico al 100%.

PathoDx	MicroTrak®	
	Positivo	Negativo
Positivo	82	0
Negativo	0	168

**Specificità**

Per stabilire la reattività **specificità del genere** del Reagente di conferma per Chlamidia PathoDx, sono stati esaminati membri noti del genere Chlamydia compreso *C. psittaci* e tutti i 15 sierotipi riconosciuti di *C. trachomatis*. Tutte le specie *Chlamydia* si sono colorate con fluoresceina.

Per verificare la specificità del Chlamydia Culture Confirmation Kit PathoDx, sono stati esaminati microrganismi batterici, fungini e virali per la reattività crociata (fare riferimento alla tabella riportata di seguito). I microrganismi sono cresciuti in brodo di coltura e in 10 µl di una sospensione contenente unità che formano una colonia per millilitro 1 × 10<sup>9</sup>, oppure in monostrati

cellulari infetti con virus a un MOI inferiore a 0,01, sono stati fissati su un vetrino in conformità alla procedura specificata in questo documento. Nessuno di questi microrganismi esaminati ha mostrato alcuna reattività crociata.

Microrganismo	Ceppo
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC® 17904
<i>Candida albicans</i>	166 Nelson/CA
<i>Candida tropicalis</i>	PN 1164
Cytomegalovirus	AD169
<i>Enterococcus faecalis</i>	PN 1120
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 29194
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo A	AANEN 1217
Virus dell'Herpes simplex I	MacIntyre
Virus dell'Herpes simplex II	MS
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33495
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PN 1126
<i>Lactobacillus casei</i>	PN 1078
<i>Moraxella osloensis</i>	PN 1339
<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC® 33530
<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC® 23114
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PN 1138
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PN 1177
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PN 1282
<i>Neisseria meningitidis</i> Gruppo A	ATCC® 13077
<i>Neisseria meningitidis</i> Gruppo B	ATCC® 13090
<i>Neisseria meningitidis</i> Gruppo C	ATCC® 13102
<i>Neisseria meningitidis</i> Gruppo D	ATCC® 13113
<i>Neisseria sicca</i>	PN 1101
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 25933
<i>Proteus vulgaris</i>	PN 1062
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN 1280
<i>Salmonella minnesota</i>	R 595
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC® 6539
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC® 14028
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I	ATCC® 12598
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PN 5204
<i>Streptococcus agalactiae</i>	090R
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC® 10389

**12. BIBLIOGRAFIA**

1. Beem, M.O. and E.M. Saxon. 1977. N. Engl. J. Med. 296:306-310.
2. Bowie, W.R., W. San-Pin, E.R. Alexander, J. Floyd, P.S. Forsyth, H.M. Pollock, J.L. Lin, T. M. Buchanan, and K.K. Holmes. 1977. J. Clin. Invest. 59:735-742.
3. Brunham, R.C., I.W. Maclean, B. Binns, and R.W. Peeling. 1985. J. Infect. Dis. 152:1275-1282.
4. Curran, J.W. 1980. Amer. J. Obstet. Gynecol. 138:848-851.
5. Hammerschlag, M.R., M. Anderda, D.Z. Semine, D. McComb, and W.M. McCormack. 1979. Pediatrics. 64:142-148.
6. Kuo, C., S.P. Wand, B.B. Wentworth, and J.T. Grayston. 1972. J. Infect. Dis. 125:665-668.
7. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
8. Paavonen J., et al. 1978. J. Clin. Invest. 59:735-742.
9. Ripa, K.T. and P. Mardh. 1977. J. Clin. Microbiol. 6:328-331.
10. Sabet, S.F., J. Simmons, and H.D. Caldwell. 1984. J. Clin. Microbiol. 20:217-222.
11. Sawicki, L. 1980. Lab. Man. 18(11):42-47.
12. Schachter, J. 1978. N. Engl. J. Med. 298:428-435, 490-495, 540-549.
13. Schachter, J. and H.D. Caldwell. 1980. Ann. Rev. Microbiol. 34:285-309.
14. Sierra, M.F., et al. 1988. Lab. Med. 19:311-314.
15. Thompson, S.E. and A.E. Washington. 1983. Epidemiologic Rev. 5:96-123.
16. Westrom, L. 1980. Amer. J. Obstet. Gynecol. 138:880-892.

17. Laboratory Update: Isolation of Chlamydia trachomatis in Cell Culture. 1980. U.S. Dept. H.H.S., CDC # 80-109.
18. Rothermel, C.P., et al. 1989. Abstracts of the 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington, D.C.

**13. CONFEZIONE**

**REF** R62210.....100 Test/Kit

**Legenda dei simboli**

	Numero catalogo
	Dispositivo medico per la diagnostica in vitro
	Per uso in laboratorio
	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Limiti di temperatura
	Numero lotto
	Data di scadenza
	fabbricante

PathoDx è un marchio di fabbrica registrato di Remel Inc. ATCC® è un marchio di fabbrica registrato di American Type Culture Collection.

MicroTrak® è un marchio di fabbrica registrato di Trinity Biotech plc.

IFU X7784 rivisto novembre 2012



Remel Europe Ltd.  
Clipper Boulevard West, Crossways  
Dartford, Kent, DA2 6PT  
UK

Per l'assistenza tecnica, rivolgersi al distributore di zona.