

USO PROPUESTO

El anticuerpo de fluorescencia directa frente a *Chlamydia trachomatis* de PRO-LAB está diseñado para detectar e identificar los organismos de *Chlamydia trachomatis* en muestras urogenitales.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las *Chlamydias* son bacterias no móviles, gramnegativas, intracelulares obligadas. Se clasifican en un género (*Chlamydia*) consistente en tres especies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia pneumoniae*. *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* son patógenos fundamentalmente humanos mientras que *Chlamydia psittaci* es un patógeno animal que rara vez infecta a seres humanos (1).

C. trachomatis es un agente importante en las infecciones humanas que produce tracoma, linfogranuloma venéreo e infección del tracto genital en adultos y neumonía y conjuntivitis de inclusión en neonatos. La infección por *C. trachomatis* es la causa principal de uretritis no gonocócica. En varones, puede producir epididimitis mientras que en mujeres, en las que las infecciones por *C. trachomatis* son con frecuencia asintomáticas, puede producir cervicitis, salpingitis y enfermedad inflamatoria pélvica. Las dos últimas son especialmente significativas, puesto que pueden producir infertilidad (2).

El método aceptado para el diagnóstico de *C. trachomatis* es el crecimiento de muestras clínicas (habitualmente, raspados cervicales de mujeres o torundas uretrales de varones) en células huésped cultivadas en cultivo tisular. El material infectado se identifica posteriormente mediante tinción de yodo o Giemsa de los cuerpos de inclusión. Este planteamiento es caro, exige mucho trabajo y precisa 2-7 días para obtener resultados (3).

El anticuerpo de fluorescencia directa de *Chlamydia trachomatis* de PRO-LAB se usa para la detección e identificación de organismos de *C. trachomatis* en muestras clínicas. El reactivo diagnóstico es un anticuerpo IgG monoclonal murino conjugado con la fluoresceína que reconoce específicamente la Proteína Mayor de la Membrana Externa (MOMP) de los 15 serotipos de *C. trachomatis*.

PRINCIPIO

Se ha producido un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína mayor de la membrana externa de los 15 serotipos de *C. trachomatis*. El anticuerpo se conjuga con fluoresceína y tiñe los cuerpos elementales y los cuerpos reticulados de *C. trachomatis*. El reactivo no reacciona con *C. psittaci* ni *C. pneumoniae*.

Cuando se aplica el reactivo a muestras en portaobjetos de microscopio, el anticuerpo se une a cualquier *C. trachomatis* que esté presente. Lavado posteriorretira cualquier anticuerpo no unido. Cuando se ven los portaobjetos usando un microscopio de fluorescencia, las muestras que contienen *C. trachomatis* aparecerán como cuerpos elementales o reticulados verdes contrastados por un fondo rojo de células contrateñidas.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

1. **Anticuerpo de fluorescencia directa de *Chlamydia trachomatis*:**
El reactivo es un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína específico para *Chlamydia trachomatis* que se diluye óptimamente en un tampón estabilizado con proteínas incluido el azul de Evans como contratención celular y azida sódica al 0,02% como conservante. Los reactivos suministrados son suficientes para 60 tests.
2. **Medio de montaje:**
El medio de montaje está tamponado a un pH 9,0. Contiene glicerol y azida sódica al 0,095% como conservante.
3. **Portaobjetos control positivo/negativo:**
El pozo positivo contiene células de mamífero fijadas que han sido infectadas previamente con *C. trachomatis*. El pozo de control negativo contiene células de mamífero fijadas. El portaobjetos está envasado individualmente para un sólo uso y se suministra con un desecante. El portaobjetos debe conservarse a 2°C-8°C. Permita que el portaobjetos alcance la temperatura ambiente antes de su uso.

 **Precaución:** La *Chlamydia trachomatis* presente en el pozo de control positivo suele ser habitualmente no infeccioso en cultivo. **Sin embargo, se recomienda que se manipule el portaobjetos usando las mismas precauciones que con cualquier material potencialmente infeccioso.**

CONSERVACIÓN

Conserve el anticuerpo de fluorescencia directa de *Chlamydia trachomatis* PRO-LAB en la oscuridad a 2°-8°C. No congele el reactivo, porque esto puede conducir a una disminución en el rendimiento de la prueba. Conserve el medio de montaje a 2°-8°C.

NO USE NINGUNO DE LOS PRODUCTOS ANTERIORES DESPUÉS DE LA FECHA DE CADUCIDAD INDICADA EN LA ETIQUETA.

MATERIALES / EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Torundas de Rayon (estériles).
Cámara húmeda (puede hacerse una simple colocando toallas de papel húmedo en un recipiente resellable).
Microscopio de fluorescencia equipado con un sistema de filtro para FITC (pico de absorción de 495 nm, pico de emisión de fluorescencia de 525 nm).
Paños de laboratorio.
Metanol.
Portaobjetos de microscopio (pozo de 8 mm) con revestimiento resistente al metanol. (Pro-Lab PL.1018 o equivalente)
Cubreobjetos del portaobjetos de microscopio (22 x 40-60 mm).
Pipeta (30 ul).

RECOGIDA DE MUESTRAS

- A. **Muestras uretrales (en varones):**
El paciente no debe haber orinado durante una hora antes de obtener una muestra.
 1. Inserte una torunda uretral con punta de rayón en la uretra.
 2. Rote la torunda para recoger células epiteliales y retírela.
 3. Coloque la muestra en un portaobjetos como se describe en PREPARACIÓN DEL PORTAOBJETOS.
- B. **Muestras cervicales:**
 1. Limpie el exocérnix para eliminar el exceso de moco.
 2. Inserte una torunda con punta de esponja o punta de rayón en el canal endocervical hasta que la mayor parte de la punta no esté visible.
 3. Rote la torunda durante 5-10 segundos dentro del canal endocervical.
 4. Retire la torunda sin tocar ninguna superficie vaginal.
 5. Coloque la muestra en un portaobjetos como se describe en PREPARACIÓN DEL PORTAOBJETOS.

PREPARACIÓN DEL PORTAOBJETOS

Los portaobjetos deben estar preparados de muestras de torundas inmediatamente después de la recogida de la muestra.

1. Pase rodando firmemente un lado de la torunda por encima de la mitad superior del pozo del portaobjetos y luego gire el otro lado sobre la mitad inferior. Cubra todo el pozo uniformemente y permanezca dentro del perímetro del pozo.
2. Compruebe que el pozo está cubierto de forma uniforme con muestra.
3. Deje que la muestra se seque al aire completamente.
4. Inunde el portaobjetos con 0,5 ml de fijador de metanol y deje que toda la cantidad de fijador se evapore a temperatura ambiente. Para facilitar la evaporación, incline el portaobjetos después de cinco minutos para drenar el exceso de fijador.
5. Para obtener los mejores resultados, tiña inmediatamente. La muestra debe transportarse a temperatura ambiente o refrigerarse a 2°-8°C. Si la muestra fijada se va a mantener durante cualquier período de tiempo, debe conservarse a -20°C.

PROCEDIMIENTOS

1. Permita que el kit y la muestra de prueba alcancen temperatura ambiente.
2. Añada 30 µl del reactivo de anticuerpo fluorescente directo de *Chlamydia trachomatis* al portaobjetos del paciente asegurándose de que se cubre toda el área de la muestra. Incube la muestra a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante 15 minutos.
NOTA: Puede producirse tinción inespecífica si se deja que el reactivo se seque sobre el portaobjetos.
NOTA: Una vez que se ha añadido el reactivo DFA al portaobjetos, evite la exposición innecesaria a la luz directa.
3. Lave el reactivo no unido del portaobjetos sumergiéndolo en agua destilada varias veces.

- Después del lavado, use un paño de laboratorio para limpiar el portaobjetos alrededor del área de la muestra para retirar el exceso de humedad, teniendo cuidado de no alterar o eliminar ninguna parte de la muestra.
- Añada una gota de medio de montaje al portaobjetos. Coloque el cubreobjetos y evalúe la muestra con un microscopio de fluorescencia usando un aumento de 400 veces para el cribado y un aumento de 1.000 veces para confirmar la morfología.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Toda el área de las muestras debe ser estudiada cuidadosamente en cuanto a organismos *Chlamydia trachomatis*. Los cuerpos elementales han estado o están en el proceso de ser liberados de las células y por tanto, pueden estar presentes dentro de la célula o en los espacios extracelulares. Los cuerpos elementales presentes en la célula aparecerán como estructuras circulares bien definidas que tienen una fluorescencia verde brillante frente a un fondo rojo de células contraheñidas. Los cuerpos elementales presentes en las áreas extracelulares de la muestra aparecerán como una fluorescencia verde brillante frente a un fondo negro. Ocasionalmente, pueden verse inclusiones intracelulares, áreas grandes de fluorescencia verde brillante que indican la presencia de numerosos cuerpos reticulados muy amontonados.

La presencia de cuerpos elementales debe usarse como criterio diagnóstico. El cuerpo elemental es la forma infecciosa del organismo y se distingue fácilmente de cualquier otra partícula fluorescente debido a su morfología e intensidad de fluorescencia homogéneas.

- PORTAOBJETOS CONTROL:** La interpretación correcta del resultado de la prueba exige que se estudien un portaobjetos de control positivo y otro de control negativo con cada lote de diapositivas. El portaobjetos positivo aporta un ejemplo del tamaño y la forma de los cuerpos elementales y sus fluorescencias, estos discos verdes brillantes (de 250-300 nm de tamaño) deben usarse como estándar para puntuar las muestras de los pacientes. El portaobjetos de control negativo sólo mostrará el fondo rojo de las células contraheñidas.
- RESULTADOS POSITIVOS:** La presencia de 10 o más cuerpos elementales en una muestra es criterio para un resultado positivo. Estos cuerpos elementales deben ser comparables en aspecto a los presentes en el portaobjetos control. Los cuerpos elementales deben examinarse con gran aumento para asegurar que los cuerpos fluorescentes son homogéneos en tamaño y forma.
- RESULTADO NEGATIVO:** La prueba es negativa cuando la muestra carece de partículas fluorescentes verdes y las células contraheñidas son claramente visibles y suficientes en número para asegurar que se obtuvo una muestra adecuada.

LIMITACIONES

- Se ha establecido el rendimiento del anticuerpo fluorescente directo de *Chlamydia trachomatis* PRO-LAB para la detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras urogenitales.
- Los resultados de la prueba deben interpretarse con cuidado cuando se usan para poblaciones de baja incidencia.
- El rendimiento óptimo de esta prueba depende de la recogida de una buena muestra del paciente y de una técnica adecuada de extensión en el portaobjetos.
- Las valoraciones de detección directa pueden mostrar una fluorescencia inespecífica debido a la presencia de bacterias u hongos. Por tanto, la interpretación exige personal con experiencia en

microscopía de fluorescencia.

- El rendimiento de la prueba depende de un microscopio debidamente alineado dotado con un sistema de filtro para la detección de emisión de luz fluorescente.

PRECAUCIONES

- Los reactivos suministrados en el Kit de Anticuerpo Fluorescente Directo de *Chlamydia trachomatis* de PRO-LAB son EXCLUSIVAMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.
- Durante su uso y después del mismo, manipule todos los materiales de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio, considerando siempre que todos los materiales del test deben ser manipulados como potencialmente biopeligrosos.
- El reactivo y el medio de montaje contienen azida sódica  como conservante. La azida sódica puede reaccionar con plomo y cobre produciendo sales con propiedades explosivas. Deben usarse grandes volúmenes de agua cuando se eliminen los restos de reactivos.
- La recogida adecuada de las muestras es fundamental para unos resultados óptimos de la prueba. Asegúrese de que la muestra se ha tomado según el protocolo descrito.
- No utilice reactivos o portaobjetos control si los viales o la funda protectora están claramente dañados.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Se llevó a cabo un estudio de funcionamiento en un Centro Sanitario en Ontario, Canadá. El estudio incluyó 825 muestras femeninas y 425 muestras masculinas. Los cultivos fueron ensayados en paralelo utilizando el kit Pro-Lab y un kit de laboratorio alternativo. Todos los resultados fueron contrastados utilizando métodos de cultivo.

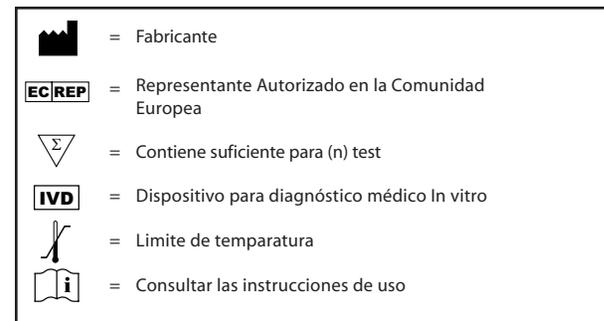
		Kit Alternativo		
		+	-	
Muestras masculinas:	Pro-Lab +	9	0	Especificidad = 100% Sensibilidad = 100%
	-	0	416	

		Kit Alternati		
		+	-	
Muestras femeninas:	Pro-Lab +	16	0	Especificidad = 100% Sensibilidad = 100%
	-	0	809	

En un segundo ensayo en el mismo centro se analizaron 660 muestras positivas en 4 lotes aparte. Se observaron un máximo de 3 resultados discrepantes (negativos) con 1 lote (3/660 = 0,46%) y la media de los resultados discrepantes fue 1 (1/660 = 0,15%), demostrando una excelente repetitividad interlotes.

REFERENCIAS

- Schachter, J.: *Chlamydiae*. in Balows, A., Hausler, W.J., Herrman, W.J., Isenberg, H.D., and Shadomy, H.J. (eds.): Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition. American Society for Microbiology, Washington, 1991, pp. 1045-1053.
- Lisby, S.M. and Nahata, M.C. 1987. Recognition and treatment of *Chlamydia* infections. *Clinical Pharmacy* 6:25-36.
- Stamm, W.E. 1988. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Annals of Internal Medicine* 108:710-717.



Las instrucciones de uso se tradujeron de manera profesional del inglés. En caso de ambigüedad o discrepancia evidente, por favor, dirijase al servicio de atención al cliente de Pro-Lab.