



## INSTRUÇÕES DE USO

Somente para Uso diagnóstico in vitro

### Chlamydia Pneumoniae G

120 testes

Revisão: Junho/2008

#### Finalidade ou Uso

A Chlamydia Pneumoniae-G (TWAR) Test System (anticorpo) é um teste de imunofluorescência indireta para a determinação qualitativa e/ou semi-quantitativa de anticorpos IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* em soro humano. É utilizado no diagnóstico da infecção primária ou da reinfecção.

#### Sumário e Introdução

Chlamydia é um grande grupo de parasitas obrigatoriamente intracelulares das células eucarióticas. Há quatro espécies: *Chlamydia psittaci*, principal patógeno animal ( causa a pneumonia no homem); *Chlamydia trachomatis*, principal patógeno humano<sup>1</sup>; *Chlamydia pneumoniae* consistindo dos isolados TWAR e TWAR-like<sup>2,3</sup>. Originalmente pensava-se que era uma cepa da *C. psittaci*<sup>4,5</sup> mas agora parece ser um patógeno humano sem evidência de ter como hospedeiros aves ou animais<sup>6,7,8</sup> e *Chlamydia pecorum* cujo papel como patógeno ainda não está bem claro<sup>9</sup>.

*C. pneumoniae* é atualmente um patógeno comumente distribuído no mundo e causa a faringite, a sinusite, a bronquite e estima-se que 10% de todas as pneumonias adquiridas. A pneumonia é geralmente branda com um infiltrado subsegmentado simples. A faringite pode ser relativamente severa com rouquidão e dor de garganta. A bronquite geralmente apresenta um começo insidioso precedido ou acompanhado de faringite. A sinusite pode aparecer sozinha ou em associação com outras síndromes. Doenças mais severas têm sido observadas em pessoas de idade e naquelas com doenças crônicas<sup>8,10</sup>. Febre pode estar presente e acompanhada por confusão e dor de cabeça, mas geralmente limitada aos primeiros dias. Tosse pode não aparecer por muitos dias, fazendo com que a doença pareça ser bifásica, mas poderá durar semanas ou meses depois disso<sup>7, 11</sup>. Além da doença respiratória, estudos soroepidemiológicos tem demonstrado a associação desse organismo com doenças da artéria coronariana<sup>11, 13</sup>, embora o papel da infecção por *C. pneumoniae* na patogenia dessa doença seja desconhecida<sup>7</sup>.

Acredita-se que a *C. pneumoniae* seja transmitida de pessoa para pessoa através das secreções do trato respiratório, apesar de o mecanismo exato não estar determinado<sup>7</sup>. O organismo parece permanecer viável sobre balcões de fórmica por 30 horas e em lenço de papel por 12 horas; entretanto o tempo de sobrevivência nas mãos fica limitado a 10-15 minutos<sup>12</sup>. A disseminação da infecção parece ser lenta, tendo um intervalo de tempo, caso a caso, de 30 dias. Dados obtidos em estudos soroepidemiológicos sugerem que as infecções por *C. pneumoniae* são comuns, sendo que 50% dos adultos da população em geral apresentam títulos de anticorpos IgG. Ambas infecções, assintomáticas e crônica por *C. pneumoniae* têm sido documentada por cultura<sup>12</sup>. Considerando a alta prevalência de anticorpos anti-*C. pneumoniae* na população e o declínio esperado nos títulos de anticorpos após a infecção, supõe-se que todas as pessoas são praticamente infectadas no mesmo estágio e que a reinfecção é comum<sup>7,13</sup>.

Tem sido identificado dois tipos de padrões de resposta à infecção por *C. pneumoniae*; a resposta primária que aparece mais frequentemente em pessoas jovens, e uma segunda resposta ou reinfecção que aparece com mais frequência em pessoas mais velhas. Na resposta primária os anticorpos IgM aparecem cerca de 3 semanas após o início da doença e os anticorpos IgG não antes de seis a oito semanas do início. Na reinfecção, não deve aparecer anticorpos IgM, porém, se presente, tende a ser em níveis baixos, enquanto que os anticorpos IgG podem apresentar títulos elevados em uma a duas semanas podendo alcançar títulos relativamente altos<sup>3</sup>. Os anticorpos IgM geralmente desaparecem em duas a seis semanas após a infecção, enquanto que os títulos de IgG persistem. Títulos elevados ou persistentes de IgA tem sugerido ser um melhor marcador da infecção bacteriana que os títulos de IgG<sup>14</sup>.

*C. pneumoniae* é difícil de crescer em cultura; portanto o diagnóstico deve se basear em testes sorológicos. O teste de Fixação de complemento (FC) gênero específico, é largamente utilizado no diagnóstico das infecções por Clamídea, particularmente psitacose e LGV, mas é relativamente insensível no diagnóstico do tracoma, inclusões conjuntivais, infecções do trato genital e infecções neonatais. Ambos os métodos, a micro-IF e a imunofluorescência indireta (IFA) são mais sensíveis e podem ser utilizados para anticorpos IgG e IgM. A micro-IF pode ser antígeno específica utilizando corpos elementares TWAR (EB) como antígeno.



O teste de IFI com inclusões totais da Chlamydia como substrato é capaz de detectar ambos os grupos (gênero) e os vários tipos de anticorpos IgG e IgM específicos para *C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae*

### **Princípio do método IFI**

Chlamydia Pneumoniae-G Test System utiliza o método de imunofluorescência indireta primeiramente descrito por Weller and Coons<sup>15</sup> e depois melhor desenvolvido por Riggs et al<sup>16</sup>. O procedimento é realizado em duas etapas básicas:

Etapa 1 : O soro humano reage com o substrato antigênico. Se houver presença de anticorpos, eles se ligarão ao antígeno formando um complexo antígeno-anticorpo estável. Se não houver anticorpos presentes, o complexo não será formado e o soro e os componentes serão eliminados por lavagem.

Etapa 2 : Anticorpos anti-IgG humana marcados com fluoresceína são adicionados no local da reação e irão se ligar aos complexos formados na etapa 1. O resultado é uma reação positiva de fluorescência verde-maçã brilhante quando observada em um microscópio próprio para fluorescência. Se o complexo não tiver sido formado na etapa 1, o anticorpo marcado com fluoresceína será eliminado por lavagem, exibindo um resultado negativo.

### **Apresentação e Composição**

#### **Lâminas substrato**

Lâminas embaladas individualmente em sachets de alumínio, contendo células HEp-2 infectadas e não infectadas por uma mistura de *C. pneumoniae* (cepa CDC) fixadas a cada cavidade. Cada cavidade contém cerca de 10-50% de células infectadas por 200x de aumento. São estáveis na embalagem selada a 8°C, ou menos, até a data de validade indicada nos rótulos.

120 testes – 10 lâminas com 12 cavidades cada

#### **Soro controle positivo**

Frasco contendo soro controle humano IgG positivo para *C. pneumoniae* com estabilizantes proteicos e 0,005% de timerosal. É estável a 2-8°C até a data de validade indicada nos rótulos. O ponto final do título vem indicado na etiqueta.

120 testes – 0,5 ml

#### **Soro controle negativo**

Frasco contendo soro controle humano negativo para *C. pneumoniae* com estabilizantes proteicos e 0,005% de timerosal. É estável a 2-8°C até a data de validade indicada nos rótulos.

120 testes – 1 x 0,5 ml

#### **Meio de montagem**

Frasco conta-gotas contendo tampão glicerol fosfato a pH 7,4 ± 0,2.

É estável a 2-8°C até a data de validade indicada nos rótulos.

120 testes – 1 x 3,5 ml

#### **Conjugado fluorescente**

Frasco conta-gotas, pronto para uso, contendo imunoglobulinas de carneiro anti-IgG humanas marcadas com isotiocianato de fluoresceína, contendo 0,001% de Azul de Evans, estabilizantes proteicos, menos que 0,1% de azida de sódio e 0,001% de timerosal. É estável a 2-8°C, protegido da luz direta, até a data de validade indicada nos rótulos.

120 testes – 2 x 3,5 ml

#### **Tampão Salina Fosfato (PBS)**

Sachets de um litro cada de PBS em pó. Estável a 25°C ou menos, na embalagem selada, até a data de validade indicada nos rótulos.

120 testes – 2 sachets para 1 litro



### Preparação do Tampão

Adicionar ao conteúdo de um sachet de PBS aproximadamente 700 ml de água destilada em um balão volumétrico de 1 litro ou uma proveta graduada de 1 litro. Rinsar o conteúdo com 5-10 ml de água e adicionar ao balão. Completar com quantidade suficiente para 1 litro. Estocar em frasco limpo, etiquetado e fechado a 2-8°C. O tampão reconstituído deve ter um pH de  $7,4 \pm 0,2$ . É estável até a data de validade indicada no rótulo, se não houver contaminação. Não utilizar se o pH mudar, se a solução turvar ou se aparecerem precipitados.

### Armazenamento

O kit deve ser armazenado a 2-8°C até a data de validade indicada na etiqueta.

### Precauções e Advertências

1. O substrato antigênico foi fixado com acetona e não contém *C. pneumoniae* livre detectável. Entretanto, deve ser manipulado e descartado como um material potencialmente infectante
2. Não remover as lâminas dos sachets antes do momento do uso. Não utilizar os sachets se houver perfuração, indicado pela aparência de murcho do mesmo.
3. Todos os reagentes devem estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes do uso
4. Resultados fora do normal podem ocorrer se as lâminas secarem durante o procedimento.
5. A refrigeração (2-8°C) do kit imediatamente após a sua chegada assegura a estabilidade até a data de validade indicada.
6. Os reagentes devem ser utilizados antes da data de validade
7. A substituição dos componentes por outros que não os fornecidos podem levar a resultados inconsistentes.
8. Não expor o conjugado a luz direta durante o seu armazenamento e utilização
9. Evitar contaminação microbiana de todos os reagentes envolvidos no procedimento do teste ou poderão ocorrer resultados incorretos.
10. O não acompanhamento do procedimento descrito como o tempo e temperatura de incubação, poderá levar a resultados incorretos.
11. Lâminulas reusáveis devem ser lavadas e rinsadas abundantemente para retirada de detergentes.
12. Cuidado para não produzir respingos e aerossóis em geral
13. Após descongelamento, as amostras previamente congeladas, devem ser vigorosamente homogeneizadas antes do teste.
14. As amostras dos pacientes, assim como os materiais que entrarem em contato com elas, devem ser manipuladas segundo as normas usuais para materiais contaminados. Jamais pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e mucosas.
15. Os soros utilizados para preparar os controles positivo e negativo foram testados, sendo negativos (não repetidamente reativos) para a presença do HbsAg e anticorpos anti-HIV1 segundo métodos aprovados pelo FDA. Entretanto, como nenhum teste pode oferecer garantia total que os vírus da Hepatite B ou HIV1 ou outro agente infectante estejam ausentes, esses reagentes devem ser manipulados segundo as normas usuais para material contaminado.
16. Os conservantes utilizados no conjugado e controles são tóxicos se ingeridos. As azidas reagem com encanamentos de cobre e chumbo formando azidas metálicas explosivas. Quando dispensar na pia, deixar drenar bastante água para minimizar o acúmulo de azidas e componentes metálicos.

### Amostra

O sangue deve ser coletado em jejum ou pelo menos uma hora após a alimentação para evitar a lipêmia do soro, pois o excesso de lipídeos pode produzir uma “camada” sobre o substrato. Coletar assepticamente 5-8 ml de sangue por venipuntura. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente (20-25°C) antes de separar o soro para evitar a hemólise que pode interferir com os resultados dos testes. As amostras devem ser armazenadas em geladeira a 2-8°C e testadas dentro de uma semana da coleta. Armazenagem por mais tempo deve ser feita a -20°C em alíquotas para evitar congelamentos e descongelamentos repetidos. Não armazenar em freezer de descongelamento automático.

Evitar utilizar soros contaminados pois podem conter enzimas proteolíticas, que irão digerir o substrato. Se necessário inativar as amostras de soro por aquecimento antes do uso, neste caso o soro deve ser utilizado a seguir.

Quando testando amostras pareadas para observação de uma infecção recente, as amostras agudas devem ser obtidas tão logo seja possível após o início da doença e a amostra de convalescência obtida 7 a 14 dias



após. As amostras aguda e de convalescência devem ser testadas simultaneamente no mesmo ensaio, e observado uma mudança significativa no título de anticorpos entre as amostras pareadas. Se a primeira amostra for obtida muito tarde no curso da infecção, um título significativo pode não ser detectado.

### Procedimento

### **Materiais fornecidos**

1. Lâminas contendo o substrato antigênico *C. pneumoniae*
2. Conjugado (anticorpo) fluorescente
3. Soro controle positivo
4. Soro controle negativo
5. Tampão salina fosfato (PBS)
6. Meio de montagem

### **Materiais requeridos, mas não fornecidos.**

1. Balão volumétrico ou proveta graduada
2. Água destilada tipo CAP ou equivalente
3. Um frasco de um litro com tampa de rosca.
4. Tubos descartáveis e rack
5. Pipetas sorológicas descartáveis
6. Pipetas calibradas para dispensar 50 e 100µl com ponteiros descartáveis
7. Pipetas Pasteur e bulbo
8. Câmara úmida
9. Pissete plástico para lavagem
10. Jarras de Coplin ou placas com apoio para lâminas
11. Lamínulas no. 1, 24 x 60 mm
12. Caneta de marcação permanente
13. Microscópio de fluorescência equipado com luz de mercúrio ou de halogênio-tungstênio, com filtro de 390-490 nm e barreira de filtro de 515-520 e objetiva de 400x. O comprimento de onda de excitação do FITC é 490 nm e a emissão em 520 nm.

### **Procedimento do teste**

#### **1. Preparação das amostras**

##### Triagem:

Preparar uma diluição 1:80 para cada soro do paciente como a seguir:

- a. Preparar uma diluição a 1:20 adicionando 0,05 ml (50µl) do soro do paciente a 0,95 ml de PBS no tubo #1. Misturar
- b. Preparar uma diluição a 1:80 adicionando 0,1 ml (100µl) do tubo #1 a 0,3 ml de PBS no tubo #2. Misturar.
- c. Utilizar o tubo #2 como diluição de triagem

##### Semi-quantitativo:

Diluições do soro são utilizadas para determinar o título de anticorpos. Cada laboratório deve estabelecer seu próprio protocolo de diluição. Sugerimos a seguinte titulação seriada:

- A. Preparar uma diluição a 1:20 para cada soro adicionando 0,05 ml (50µl) do soro do paciente a 0,95 ml de PBS no tubo #1.
- b. adicionar 0,3 ml de PBS aos tubos #2, #3, #4 e #5
- c. utilizando uma pipeta de 100µl transferir 0,1ml (100µl) do tubo 1 para o tubo 2. Misturar. Utilizando uma nova ponteira para cada diluição, transferir 0,1 ml (100µl) do segundo tubo para o terceiro, do terceiro para o quarto e do quarto para o quinto, misturando após cada transferência.
- d. Não utilizar o tubo #1. Iniciar pelo tubo #2.

Isto fornecerá uma diluição na razão 4 com as seguintes diluições:

(Tubo #1 = 1:20 , não utilizado)

Tubo #2 = 1:80

Tubo #3 = 1:320

Tubo #4 = 1:1280

Tubo #5 = 1:5120



#### **2. Preparação da lâmina**

Retirar da geladeira quantas lâminas forem necessárias e aguardar equilibrar a temperatura ambiente (20-25°C) por pelo menos 5 minutos. Retirar as lâminas dos sachets, tendo o cuidado de não tocar a superfície contendo o antígeno. Identificar cada lâmina utilizando uma caneta de marcação.

#### **3. Aplicação da amostra**

Utilizando pipetas Pasteur individuais, aplicar uma gota (20-30µl) de cada diluição do soro do paciente e dos controles positivo e negativo as cavidades individuais da lâmina. Não tocar a superfície contendo o antígeno com pipeta durante a pipetagem. Não deixar que as gotas se misturem; uma reação cruzada de amostras entre as cavidades pode causar resultados errados.

#### **4. Incubação 1**

Incubar em câmara úmida a temperatura ambiente (20-25°C) por 30 minutos.

**NOTA: O antígeno não deve secar durante nenhuma das seguintes etapas. Ligações inespecíficas poderão ocorrer se o reagente secar sobre a lâmina.**

#### **5. Rinsagem 1**

Após a incubação retirar as lâminas da câmara úmida e rinsar cuidadosamente utilizando um pissete. Não dirigir o jato de PBS diretamente sobre as cavidades. Para prevenir contaminações cruzadas primeiro inclinar a lâmina na direção das cavidades 1-6 e aplicar o PBS ao longo da parte central da lâmina, fazendo com que o PBS escorra para fora pela borda de cima da lâmina. Então inclinar a lâmina em direção as cavidade 7-12 e repetir o procedimento, fazendo com que o PBS escorra pela parte de baixo da lâmina. Para lâminas de 6 cavidades, inclinar a lâmina para baixo e aplicar o PBS por cima das cavidades, fazendo com que escorra pela parte de baixo da lâmina.

#### **6. Lavagem 1**

Colocar as lâminas em jarras de Coplin ou placas e lavar duas vezes com PBS por 5 a 6 minutos cada, agitando cuidadosamente na colocação e antes da retirada do mesmo.

#### **7. Aplicação do conjugado**

Retirar as lâminas ao final da lavagem, retirar o excesso de PBS, secar o lado de fora das bordas, se necessário, e retornar para a câmara úmida. Utilizando o frasco conta-gotas fornecido, aplicar uma gota do conjugado a cada cavidade, tendo certeza que cada cavidade está completamente coberta.

#### **8. Incubação 2**

Incubar em câmara úmida a temperatura ambiente (20-25°C) por 30 minutos. Proteger as lâminas da luz direta.

#### **9. Rinsagem 2**

Após a incubação retirar as lâminas da câmara úmida e rinsar cuidadosamente utilizando um pissete. Seguir o sugerido na etapa 5, não direcionando o jato do PBS diretamente sobre as cavidades.

#### **10. Lavagem 2**

Colocar as lâminas em jarras de Coplin ou placas e lavar duas vezes com PBS por 5 a 6 minutos cada, agitando cuidadosamente na colocação e antes da retirada do mesmo.

#### **11. Colocação das Lamínulas**

Retirar as lâminas ao final da lavagem, retirar o excesso de PBS, e imediatamente adicionar 2 gotas do meio de montagem sobre a lâmina. Inclinar a lâmina apoiando a borda da lamínula sobre a parte inferior da mesma, permitindo que o meio de montagem forme uma gota entre a lamínula e a lâmina. Cuidadosamente empurrar a lamínula da parte inferior para a parte superior da lâmina, não deixando formar bolhas. Secar o excesso do meio de montagem pressionando a parte superior da lâmina contra papel absorvente. Limpar a parte de trás da lâmina.



#### **12. Leitura**

Examinar as lâminas assim que possível, utilizando um microscópio de fluorescência. Recomenda-se que as lâminas sejam examinadas no mesmo dia do teste. Se algum contratempo ocorrer, estocar as lâminas na geladeira (2-8°C) protegidas da luz direta e ler no dia seguinte.

Não deixar o meio de montagem secar entre a lâmina e a lamínula. Se isso ocorrer adicionar mais meio de montagem ou recolocar uma nova lamínula.

### **Grau de intensidade da fluorescência**

A intensidade de fluorescência pode ser semi-quantificada seguindo-se as seguintes regras estabelecidas pelo Center for Disease Control, Atlanta, Georgia<sup>21</sup>.

4+ = fluorescência máxima, verde-amarelada brilhante.

3+ = fluorescência verde-amarelada menos brilhante

2+ = fluorescência definida, porém nebulosa.

1+ = fluorescência muito fraca

O grau de intensidade de fluorescência não é clinicamente relevante e possui somente um valor limitado como um indicador de título. Diferenças no microscópio de fluorescência, nos filtros e na fonte de luz podem resultar em diferenças de 1+ ou maior na intensidade de fluorescência quando a mesma lâmina é observada em diferentes microscópios.

### **Controle de Qualidade**

#### **Controle de especificidade**

Os controles positivo e negativo devem ser incluídos a cada corrida. Esses controles devem ser examinados antes da leitura das amostras e devem apresentar os seguintes resultados:

#### Controle negativo:

Utilizando o Controle Negativo de *Chlamydia Pneumoniae*-G (TWAR) Test System fornecido no kit, as células devem apresentar uma fluorescência menor que 1+ e parecerem vermelho-alaranjadas devido ao corante de fundo.

#### Controle positivo:

Utilizando o Controle Positivo de *Chlamydia Pneumoniae*-G (TWAR) Test System fornecido no kit, as células infectadas devem apresentar uma fluorescência específica bem definida com intensidade de fluorescência de 3+ ou mais. O padrão de fluorescência consiste em corpos de inclusões intracitoplasmáticas bem definidas perto do núcleo da célula. A localização dos corpos elementares pode ser dentro e entre as células. As células não infectadas coram-se de vermelho-alaranjadas devido ao corante de fundo.

Cada controle deve apresentar a reação esperada para validação do teste. Se os controle falharem, os resultados não podem ser reportados e o teste deve ser repetido. Se após a repetição do teste os controles continuarem a falhar, não reportar os resultados.

#### Controle de sensibilidade

Um controle titulado incluído a cada corrida testará além da sensibilidade do antígeno, a técnica, a qualidade do conjugado e do sistema óptico. O título final de cada lote de Soro controle positivo deve ser determinado. Ele deve apresentar não mais que dois títulos de diferença (+/-) do título anunciado. Em cada corrida deve-se incluir a diluição final, e uma diluição acima e uma abaixo da referente ao ponto final. A diluição mais concentrada deve ser positiva e a menos concentrada negativa. Se os controles não responderem como descrito, os resultados do teste estão invalidados e devem ser repetidos. Se após a repetição do teste os controles continuarem a falhar, não reportar os resultados.

### **Leitura dos Resultados**

#### **Negativo**

Uma diluição de um soro é considerada negativa para anticorpos IgG anti-*Chlamydia pneumoniae* se as células apresentarem menos que 1+ de fluorescência e as células aparecerem vermelho-alaranjadas devido ao corante de fundo, ou se a fluorescência observada não for a de um padrão específico para *C. pneumoniae*.



Uma amostra é considerada negativa para anticorpos IgG anti-*C. pneumoniae* se apresentar menos que 1+ de fluorescência na diluição de 1:80 e nas diluições maiores, ou se a fluorescência observada não for descrita como um padrão para *C. pneumoniae*.

... amostras negativas podem apresentar uma fraca fluorescência maior que o Controle negativo, porém menor que 1+

... coloração inespecífica em todas as células observada em alguns soros em baixas diluições parece mais ser devido a presença de autoanticorpos contra os componentes celulares tanto do núcleo como do citoplasma

... a coloração de outras áreas que não as células infectadas por *C. pneumoniae* devem ser interpretadas como negativas e uma atenção deve ser dirigida para algumas etapas específicas do método de procedimento (ex.: Etapas de Rinsagem e Lavagem).

**Positivo:**

Uma diluição de um soro é considerada positiva para anticorpos IgG anti- *C. pneumoniae* se uma houver uma coloração fluorescente bem definida das inclusões intracitoplasmáticas perto do núcleo das células e os corpos elementares localizados dentro ou entre as células da cultura de tecido forem observadas com uma intensidade de fluorescência 1+ ou mais.

O número de células que apresentam reação de coloração positiva e o tipo de fluorescência descrita deve se aproximar do número de células que o controle positivo apresentar.

Uma amostra é considerada positiva para anticorpos IgG anti- *C. pneumoniae* se apresentarem as características do padrão de coloração com intensidade de fluorescência de 1+ ou mais na diluição do soro de 1:80 ou maior.

Nota: cada cavidade poderá conter células que não apresentem fluorescência verde-maça. Se no teste do paciente as células apresentarem fluorescência verde-maça no núcleo e/ou no citoplasma uma reação auto-imune devido a presença de auto-anticorpos pode ser considerada<sup>18,19</sup>. Recomenda-se que essas amostras sejam diluídas além da interferência para uma melhor interpretação. É possível que auto-anticorpos mascarem a coloração específica fazendo com que não seja possível a interpretação. Se isso ocorrer, os resultados devem ser reportados como “Impossibilidade de interpretação devido a presença de anticorpos interferentes”.

**Titulação**

Se uma titulação semi-quantitativa é realizada, os resultados devem ser reportados como o recíproco da última diluição que apresenta uma fluorescência de 1+ verde-maça com um padrão claramente distinto. Quando da leitura serial de diluições na razão 4, o ponto final pode ser extrapolado se necessário.

Exemplo de extrapolação de um ponto final:

- 1: 80 = 4+
- 1:320 = 3+
- 1:1280 = 2+
- 1:5120 = +/-

A extrapolação do ponto final é reportado como 2560.

**Interpretação dos resultados**

Resultado	Interpretação de um resultado único
Menor que 80	Não parece ser uma infecção aguda por <i>C. pneumoniae</i> <u>Nota:</u> Pode ser uma infecção primária, cuja resposta imune humoral ainda não está desenvolvida a níveis detectáveis. Se mesmo assim ainda se suspeitar de infecção por <i>C. pneumoniae</i> , uma segunda amostra deve ser obtida 7-14 dias mais tarde, e as amostras pareadas devem ser testadas simultaneamente, procurando-se pela soroconversão
80 ou maior	Positiva para anticorpos anti- <i>C. pneumoniae</i> Pode representar: - uma infecção primária (geralmente 640 ou maior) - uma exposição passada à <i>C. pneumoniae</i> com títulos de IgG persistente (geralmente entre 80-320) - um anticorpo adquirido passivamente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou transferência placentária (geralmente 320 ou menor)

**Nota:** O título de um amostra única não deve ser o único critério a ser utilizado no diagnóstico de infecção por *C. pneumoniae*. Amostras pareadas (aguda ou de convalescência) devem ser colhidas e testadas simultaneamente para se observar a soroconversão ou um aumento significativo de título. Quando somente uma amostra é disponível, a pesquisa da presença de anticorpos IgM anti- *C. pneumoniae* poderá ajudar no diagnóstico de uma infecção ativa.

Resultado da amostra aguda	Resultado da amostra de convalescência	Interpretação de resultados de amostras pareadas

Menor que 80	Menor que 80	Não parece ser uma infecção aguda por <i>C. pneumoniae</i>  <u>Nota:</u> Poderá representar uma infecção aguda se o tempo de obtenção da Segunda amostra for muito perto da primeira. Neste caso, obter uma terceira amostra 7-14 dias após a segunda e testar as três simultaneamente, procurando pela soroconversão.
Menor que 80	80 ou Maior	Grande suspeita de uma infecção primária por <i>C. pneumoniae</i> , a não ser que o indivíduo recebeu recentemente um anticorpo passivo.
80 ou maior	80 ou maior mas com uma diferença de menos de 4 títulos em relação a amostra aguda	Evidência não significativa de uma infecção atual. Parece mais uma exposição passada à <i>C. pneumoniae</i> . Poderá representar: - um anticorpo passivo adquirido por transfusão sanguínea, transplante de órgãos... - uma infecção primária, mas o tempo de obtenção da Segunda amostra em relação a primeira não foi suficiente para desenvolvimento de um aumento de 4 títulos. Neste caso, obter uma terceira amostra 7-14 dias após a segunda e testar as três simultaneamente, procurando por um aumento significativo de título. - Uma infecção primária, se a primeira amostra foi obtida após o início e os anticorpos já tiverem alcançado um platô.  <u>Nota:</u> a pesquisa da presença de anticorpos IgM anti-Chlamydia poderá ajudar no diagnóstico de uma infecção ativa, quando ocorrer menos de 4 diluições de diferença entre as amostras.
80 ou maior	Maior que 80 ou mas com uma diferença de 4 títulos ou mais em relação a amostra aguda	Geralmente indica uma infecção por Chlamydia, ativa ou recente

### Resolução de problemas

Possíveis soluções para os problemas ocorridos em testes de imunofluorescência são discutidos em uma brochura que acompanha o kit intitulado como "Resolução de problemas em imunofluorescência"

### Limitações do procedimento

- Os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos anti- *C. pneumoniae* devem ser utilizados em conjunto com informações disponíveis através da avaliação clínica e outras informações diagnósticas.
- Um título único de anticorpo IgG anti- *C. pneumoniae* não deve ser utilizado como o único critério para diagnóstico. Amostras de soro pareadas (aguda e convalescência) e a pesquisa de IgM específica para *C. pneumoniae* poderão fornecer dados mais significativos.
- Um resultado negativo não necessariamente descarta uma infecção recente ou atual. As amostras devem ser coletadas assim que possível antes que a demonstração de anticorpos esteja presente



- O teste para *C. pneumoniae* IFI utilizando inclusões de clamídea inteiras como substrato é capaz de detectar ambos os grupos (gênero) a maioria dos anticorpos tipo IgG e IgM para *C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae*.
- Um aumento não significativo nos títulos não exclui a possibilidade de uma infecção recente e talvez indique que a amostra da fase aguda foi obtida muito tarde.
- Resultados positivos em cordão umbilical ou neonatos devem ser interpretados com cautela. A presença de anticorpos anti- *C. pneumoniae* no cordão é geralmente devida à transferência passiva da mãe para o feto. Um teste negativo, entretanto, pode ser útil na exclusão de uma possível infecção<sup>20</sup>.
- Resultados positivos em amostras de pacientes imunossuprimidos e mulheres grávidas podem ser de difícil interpretação.
- Resultados positivos não são válidos em pessoas que receberam transfusão de sangue ou produtos derivados de sangue nos últimos meses.
- A presença de anticorpos anti-nucleares (ANA) no soro poderá interferir no teste de Chlamydia por IFI. Eles podem ser diferenciados na coloração pois os anticorpos ANA coram o núcleo de todas as células; enquanto que os anticorpos anti- *C. pneumoniae* exibem coloração em 10-50% das células<sup>18</sup>
- Fluorescência citoplasmática na maioria das células podem ser devido a presença de anticorpos anti-mitocôndria (AMA) que aparecem na cirrose biliar primária<sup>29</sup>. Eles podem ser diferenciados da coloração

específica, pois AMA cora o citoplasma de todas as células; enquanto que os anticorpos anti-Chlamydia exibem coloração em 10-50% das células.

11. A reação de ponto final pode variar dependendo do laboratório devido a diferenças no tipo e condições do microscópio de fluorescência utilizado, do material de diluição, do procedimento de teste realizado, assim como da experiência do técnico
12. Se em ambos os controles positivo e negativo as células substrato não forem visualizadas quando observadas ao microscópio de fluorescência, é necessário mudar ou realinhar a fonte de luz e checar os filtros específicos.
13. As lâminas contendo como substrato uma cultura de células podem apresentar uma fluorescência inespecífica devida a uma contaminação do conjugado, ou da solução de Lavagem/rinsagem PBS com bactérias e fungos. É muito importante que o corpo técnico responsável pela leitura das lâminas possua experiência em microscopia fluorescente.

#### Limitações específicas para o teste de *C. pneumoniae*

1. Os dados sorológicos estão sujeitos a um considerável número de incertezas, pois a resposta de anticorpos ao organismo pode variar, a própria dose de infectividade, o modo de infecção e exposição prévia ou lembranças de resposta a outras Chlamydiae<sup>11</sup>. Na infecção primária, os anticorpos IgM anti-*C. pneumoniae* podem não se desenvolver antes de três semanas após o início dos sintomas e os anticorpos IgG não antes de seis a oito semanas. Se uma segunda amostra de soro for obtida com menos de 3 semanas do início, os anticorpos podem ser omitidos<sup>10,21</sup>.
2. Na reinfeção, não deve aparecer anticorpos IgM, porém, se presente, tende a ser em níveis baixos, enquanto que os anticorpos IgG podem apresentar títulos elevados em uma a duas semanas alcancem títulos relativamente altos<sup>3</sup>.

#### Valores esperados

A infecção por TWAR ocorre em todo o mundo. Surtos epidêmicos (epidemia) foram descritos na Dinamarca, Finlândia, Inglaterra, Noruega e Estados Unidos. Testes sorológicos tem demonstrado que 30-50% da população apresenta anticorpos TWAR. Anticorpos IgG são raramente observados em crianças antes da idade de dois anos, mas a prevalência aumenta após sete anos de idade, mantem um platô em 30 anos e persiste no idoso<sup>22</sup>

Um estudo foi realizado com 386 estudantes com doença respiratória aguda na Universidade de Washington durante um período de 2 anos e meio. Evidências sorológicas de infecção por TWAR foi encontrada em 13 estudantes com isolamento de TWAR em oito desses estudantes. A infecção por TWAR foi encontrada em 12% dos estudantes com pneumonia (9 em 76), 5% dos estudantes com bronquite (3 em 63) e 1% daqueles com faringite (1 em 150)<sup>5</sup>.

Em um estudo realizado durante um período de 5 anos em 667 estudantes de Universidade com doença respiratória aguda, as seguintes conclusões foram tiradas. Um título de IgG para *C. pneumoniae* de 1:512 ou maior foi determinado agudo e considerado presuntivo para infecção por *C. pneumoniae* atual. Títulos de IgG igual ou maior que 1:16, porém menor que 1:512 foi considerado ser anticorpos persistentes e indicativo de uma infecção passada a *C. pneumoniae*.



O estudo foi realizado com 100 amostras de soros normais dos Estados Unidos Central. Utilizando o kit em estudo os seguintes resultados foram obtidos. 26% das amostras apresentaram título menor que 1:80, 60% apresentaram títulos entre 1:80 e 1:320, e 14% títulos igual ou superior a 1:640.<sup>23</sup>

#### Características Específicas de Desempenho

As lâminas de Chlamydia Pneumoniae (TWAR) foram avaliadas para a presença do antígeno de *C. pneumoniae* específico utilizando antisoros monoclonais comerciais. Uma reação positiva foi identificada com a cultura de células infectadas quando corada pelo antisoro correspondente<sup>23</sup>. Além disso, não ocorre reatividade cruzada com outros antisoros monoclonais e o antígeno de *C. pneumoniae*<sup>23</sup>.

Cada laboratório deve determinar suas próprias características de desempenho utilizando todos os reagentes fornecidos para realização do teste IFI.

#### Bibliografia

1. Schachter J, Caldwell HD. Ann. Ver. Microbiol., 34:285-309, 1980
2. Grayston JT et al. Int. J. of System Bact. 39:88-90,1989.
3. Grayston JT et al. Eur. J. Clin. Micro. Infect Dis. 8:191-201, 1989.
4. Kuo CC et al. J. Clin. Micro. 24:1034-7, 1986.
5. Grayston JT et al. N. Engl. J. Med. 315:161-168,1986.

6. Grayston JT et al. J. Infect. Dis. 159: 1111-1114, 1989
7. Grayston JT. Clin. Infect Dis.; 15:757-763, 1992
8. Appleman Maria D. ASCP Fall 1991 Teleconference Series, august 27, 1991
9. Schachter J and Stamm WE. Chlamydia, in Manual of Clinica Microbiology, 6<sup>th</sup> ed., PR Murray, EJ Baron et als (eds) , ASM Press, Washington DC, 669-677, 1995.
10. Grayston JT eta al. J. Infect Dis.; 161:618-625, 1990
11. Cook PJ and Honeybourne D. J. Antimicrob. Chemo.; 34:859-873, 1994
12. Falsey AR and Walsh EE. J. Infect Dis.; 168:493-496, 1993
13. Kuo CC et al. J. Infect Dis.; 167:841-849, 1993.
14. Jauhianen T et al. J. Clin. Micro.; 32:839-840, 1994.
15. Weller TH, Coons AH. Exp. Biol. Med.; 86:789-794, 1954.
16. Riggs JL et al. Am. J. Pathol.; 34:1081-1097, 1958.
17. Lyerla HC, Forrester FT. , The Immunofluorescence (IF) Test, in: Immunofluorescence Methods in Virology, USDHHS, Georgia, 71-81,1979
18. Holborow EJ et al. Br. Med. J.; 11:732-734, 1957.
19. Berg PA et al. Immunol., 17:281-293, 1969
20. Chernesky MA et al. Cumitech 15, ASM, Washington, DC, March 1982.
21. Thom DH et al. Amer. J. of Epid.; 132:248-256, 1990
22. Kou CC; Grayston JT. Clin. Micro. Newsletter, 10:18, 1988
23. Data on file, Bion Enterprises, Ltd, Park Ridge, IL.

---

**Data de vencimento, No. de Lote, No. de Registro do Ministério da Saúde e Responsável Técnico:**  
VIDE EMBALAGEM

**Produzido por:** BION – Enterprises, Ltd. - USA.

**Importado e distribuído por:** Medivax Indústria e Comércio Ltda  
Av Venezuela 3, sala 303 Rio de Janeiro/RJ - CNPJ: 68.814.961-0001-73

**Atendimento ao consumidor Tel: (0xx21) 2283-2833**

---

---

**Representante Legal**  
**Ricardo Weizman**

---

**Responsável Técnico**  
**Luciana Poli Fernandes**  
**CRBio- 2 no 21.140/02**