



## INSTRUÇÕES DE USO

Somente para Uso diagnóstico in vitro

### Chlamydia IgM

120 testes

Revisão: Junho/2008

#### Finalidade ou Uso

O Chlamydia IgM Test System (anticorpo) é um teste de imunofluorescência indireta para a determinação qualitativa e/ou semi-quantitativa de anticorpos IgM anti-Chlamydia em soro humano. É utilizado auxiliando no diagnóstico da infecção primária ou da re-infecção na determinação imunológica da Chlamydia.

#### Sumário e Introdução

A Chlamydia é um grande grupo de parasitas intracelulares obrigatórios de células eucarióticas. Existem quatro espécies: *Chlamydophila psittaci*, principalmente um patógeno animal (embora possa causar pneumonia no homem); *Chlamydia trachomatis*, principalmente um patógeno humano<sup>1</sup>; e mais recentemente foi estabelecida a *Chlamydophila pneumoniae* consistindo dos isolados TWAR e TWAR-like<sup>2,3</sup>. Originalmente pensava-se que era uma cepa da *C. psittaci*, mas agora parece ser um patógeno humano sem evidência de ter como hospedeiros aves ou animais<sup>3,6</sup>. A quarta espécie, *Chlamydophila pecorum*, foi descrita, mas seu papel como patógeno ainda não está bem claro<sup>7</sup>.

As maiores infecções causadas pela Chlamydia são a pneumonia, o Linfogranuloma venéreo, o tracoma, as inclusões conjuntivais e as infecções do trato genital<sup>8</sup>. A *C. trachomatis* tem sido descrita como o maior agente etiológico das doenças sexualmente transmissíveis. Em homens, Chlamydia está associada com uretrite não gonocócica (NGU), uretrite pós-gonocócica e epididimite<sup>10,11</sup>.

As enfições clamidianas não respondem ao tratamento com penicilina utilizada nas uretrites gonocócicas; portanto, a uretrite pode persistir após a erradicação da infecção gonocócica. Nas mulheres, Chlamydia está associada às infecções genitais não específicas que podem incluir a cervicite, a uretrite e a salpingite aguda<sup>12,13</sup>. A *C. trachomatis* também está relacionada com doenças inflamatórias da pélvis que incluem inflamação da cervix, útero, Trompas de Falópio e ovários<sup>9</sup>. A patologia vai de assintomática a muito grave<sup>14,15</sup>. Uma alta taxa de infecções neonatais parecem advir de mulheres grávidas, genitalmente infectadas por *Chlamydia trachomatis*, principalmente a pneumonia e a conjuntivite infantil<sup>16,17</sup>. *C. pneumoniae* causa doenças agudas do trato respiratório como a faringite, a sinusite, a bronquite e é a maior causa das pneumonias atípicas geralmente confundidas com *Mycoplasma pneumoniae* e *Legionella*<sup>3</sup>.

Toda Chlamydia compartilha de um antígeno comum, mas ele inclui uma variedade de microorganismos com diferenças biológicas, sorológicas e propriedades patogênicas. Tracoma, inclusões conjuntivais e infecções do trato genital podem ser diagnosticados pela detecção de um significativo aumento no título das amostras de soro pareados na fase aguda e na convalescência, particularmente na Psitacose. Contudo, geralmente é difícil de demonstrar o aumento do título de anticorpos, particularmente em indivíduos de uma população sexualmente ativa com muitas infecções crônicas ou de repetição. Também é difícil demonstrar o aumento de títulos de IgG com LGV, pois o paciente geralmente vai ao médico após a fase aguda; porém, casos ativos geralmente apresentam um nível relativamente alto de IgM. Altos níveis de IgM também estão associados a *C. pneumoniae* em neonatos já que a detecção de IgG é menos útil, pois os altos níveis podem ser adquiridos da mãe infectada<sup>7</sup>.

Comumente o diagnóstico da Chlamydia envolve a demonstração das inclusões intracitoplasmáticas típicas identificadas pelas colorações de imunofluorescência, iodina ou Giemsa de culturas de células tratadas com cicloheximida. Já que as culturas de células são relativamente demoradas, preferem-se os testes sorológicos. O teste de Fixação de complemento (FC) gênero específico é largamente utilizado no diagnóstico das infecções por Chlamydia, particularmente na 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 com um único sorovar, mas é geralmente realizada com uma mistura de todos os 15 ou mais tipos antigênicos. 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*<sup>17,18</sup>.



### **Princípio do método IFI**

Chlamydia M Test System utiliza o método de imunofluorescência indireta primeiramente descrito por Weller and Coons<sup>19</sup> e depois melhor desenvolvido por Riggs et al <sup>20</sup>. O procedimento é realizado em duas etapas básicas:

Etapa 1: O soro humano (fração IgM) reage com o substrato antigênico. Se houver a 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 pela lavagem.

Etapa 2: Anticorpos anti-IgM 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-maça 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 pela lavagem, exibindo um resultado negativo.

### **Apresentação e Composição**

#### **Lâminas substrato**

Lâminas embaladas individualmente em envelopes de alumínio, contendo células L929 infectadas por Chlamydia LGV tipo 1 (amostra clínica) fixadas a cada cavidade. Cada cavidade contém uma média de 10 – 50% de células infectadas por campo de 200X. 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 IgM positivo para Chlamydia com estabilizantes protéicos 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 Chlamydia com estabilizantes protéicos e 0,005% de timerosal. . É estável a 2-8°C até a data de validade indicada nos rótulos.

60 testes – 1 x 0,5 ml

120 testes – 1 x 0,5 ml

#### **Meio de montagem**

Frasco conta-gotas contendo tampão glicerol fosfato - 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-IgM (cadeia pesada) humanas marcadas com isotiocianato de fluoresceína, contendo 0,001% de Azul de Evans, estabilizantes protéicos, 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)**

Envelopes 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 envelopes para 1 litro

#### **Preparação do Tampão**

Adicionar ao conteúdo de um envelope de PBS a um balão volumétrico de 1 litro, adicionar água destilada até a marca de 1 litro, misturar e deixar por algumas horas ou durante a noite para dissolver. O tampão reconstituído deve ter um pH de 7,4 ± 0,2. Caso o PBS esteja fora destes limites ajuste o mesmo com NaOH 1 N ou HCl 1N.



Armazenar a 25°C ou menos. 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 Chlamydia viva detectável. Contudo, deve ser manipulado e descartado como um material potencialmente infectante.
2. Não remover as lâminas dos envelopes antes do momento do uso. Não utilizar os envelopes se houver perfuração, indicado pela aparência de murcho do mesmo.
3. Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (20-25°C) antes do uso
4. Resultados anormais 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 vencimento.
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. Laminulas reusáveis devem ser lavadas e rinsadas abundantemente para retirada de detergentes.
12. Cuidado para não produzir respingos e aerossóis em geral.
13. Amostras previamente congeladas devem ser vigorosamente homogeneizadas antes do teste.
14. As amostras dos pacientes, assim como o material que entrarem em contato com elas, deve ser manipulado 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&2 segundo métodos aprovados pelo FDA. Entretanto, como nenhum teste pode oferecer garantia total que os vírus da Hepatite B ou HIV1&2 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 punção venosa. 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 que podem conter enzimas proteolíticas, que poderão digerir o substrato. Não é necessário inativar as amostras de soro por aquecimento antes do uso; contudo, pode-se utilizar soro inativado pelo calor.

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 agudas 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 de Chlamydia
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
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 200X e/ou 400X. O comprimento de onda de excitação do FITC é 490 nm e a emissão é 520 nm.

## Procedimento do teste

A maior fonte de erro dos testes por IgM é a interferência devido à presença de uma IgG específica para o patógeno. Isso poderá ocorrer de duas formas:

a. Reação Falso Negativa poderá ocorrer devido altos níveis de IgG bloqueando a IgM por competição pelos sítios antigênicos durante a primeira etapa da reação. A IgG, mais ávida que a IgM, reagirá primeiro com os sítios antigênicos, bloqueando a IgM de participar da reação. A IgM será então eliminada na lavagem, não sobrando nada para reagir com o conjugado anti-IgM, isto levará a uma reação falso negativa na etapa dois do teste.

b. Reações Falso Positivas podem ocorrer quando houver a presença de Fatores Reumatóides juntamente com o anticorpo IgG específico para o patógeno. Alguns Fatores Reumatóides podem ser imunoglobulinas M anti-IgG. Quando uma IgG específica reagir com os sítios antigênicos durante a primeira etapa da reação de coloração, o Fator Reumatóide anti-IgG reagirá com a IgG marcada. O Fator Reumatóide sendo um anticorpo da classe IgM reagirá então com o conjugado anti-IgM na etapa dois da reação de coloração, resultando em uma reação falso positiva na ausência da IgM específica ao patógeno.

Portanto, é recomendado que a amostra de soro de cada paciente seja pré-tratada para remover qualquer IgG interferente pela separação da IgM da IgG utilizando qualquer metodologia padronizada<sup>21, 22, 23</sup>. Duas dessas metodologias são a cromatografia de troca iônica<sup>24</sup> e a imunoprecipitação da IgG<sup>25,26</sup>.

### **1. Preparação das amostras**

Separar a IgM da IgG tratando o soro do paciente para remover as IgG como sugerido acima.

#### Triagem:

Recomenda-se que a triagem seja realizada em uma diluição de 1:10 e 1:40<sup>27</sup>

- a. Preparar uma diluição a 1:10 do soro de cada paciente utilizando um dos tratamentos acima.
- b. Preparar uma diluição a 1:40 adicionado 0,1 ml (100µl) de uma diluição a 1:10 a 0,3 ml de PBS.

#### Semi-quantitativo:

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



a. Preparar uma diluição a 1:10 do soro de cada paciente utilizando um dos tratamentos acima.. Este será o tubo #1.

b. Adicionar 0,2 ml de PBS aos tubos #2, #3, #4 e #5.

c. Utilizando uma pipeta de 200µl, transferir 0,2 ml (200µl) do tubo #1 para o tubo #2. Misturar. Utilizando uma nova ponteira para cada diluição, transferir 0,2 ml (200µl) do segundo tubo para o terceiro, do terceiro para o quarto e do quarto para o quinto, misturando após cada transferência. Isto fornecerá uma diluição na razão 4 com as seguintes diluições:

Tubo #1 = 1:10  
Tubo #2 = 1:20  
Tubo #3 = 1:40  
Tubo #4 = 1:80  
Tubo #5 = 1:160

## **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 envelopes, tendo o cuidado de não tocar a superfície contendo o antígeno. Identificar cada lâmina utilizando uma caneta de marca texto.

## **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 a ponteira 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 de 35-37°C por 90 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 com PBS utilizando um pissete. Não dirigir o jato de PBS diretamente sobre as cavidades. Para prevenir contaminação cruzada 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 cavidades 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 no mínimo 5 minutos e no máximo 10 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. 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 de 35-37°C por 60 minutos. Proteger as lâminas da luz direta.

## **9. Rinsagem 2**

Após a incubação retirar as lâminas da câmara úmida e rinsar com PBS, 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 no mínimo 5 e no máximo 10 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 bolha. 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 semiquantificada seguindo-se as seguintes regras estabelecidas pelo Center for Disease Control, Atlanta, Georgia<sup>28</sup>.

4+ = fluorescência máxima, verde-amarelada brilhante

3+ = fluorescência verde-amarelada menos brilhante

2+ = fluorescência definida, porém nebulosa

1+ = fluorescência muito fraca, tênue

A diminuição da intensidade de fluorescência não é clinicamente relevante e tem apenas um valor limitado como indicador do título. Diferenças entre os microscópios de fluorescência, filtros e luz pode resultar em diferenças de 1+ ou mais intensidade de fluorescência quando observado a mesma lâmina utilizando microscópios diferentes.

### **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 Chamydia-M 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 Chamydia-M 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 da Chlamydia consiste em corpos de inclusões intracitoplasmáticas bem definidas perto do núcleo da célula. Corpos elementares bem definidos podem ser observados dentro e/ou entre as células. 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 reportado. 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 IgM anti-Chlamydia 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 Chlamydia.

Uma amostra é considerada negativa para anticorpos IgM anti-chlamydia se apresentar menos que 1+ de fluorescência na diluição de 1:10 e nas diluições maiores, ou se a fluorescência observada não for descrita como um padrão para Chlamydia.

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

... coloração inespecífica de todas as células em alguns soros em diluições baixas é devido à presença de auto-anticorpos contra componentes celulares tanto do núcleo ou citoplasma

... a coloração de outras áreas que não as células infectadas por Chlamydia 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 IgM anti-chlamydia se uma houver uma coloração fluorescente bem definida das inclusões citoplasmáticas 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 IgM anti-chlamydia se apresentarem às características do padrão de coloração com intensidade de fluorescência de 1+ ou mais na diluição do soro de 1:10 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 à presença de auto-anticorpos pode ser considerada <sup>22,23</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 à interpretação. Se isso ocorrer, os resultados devem ser reportados como "Impossibilidade de interpretação devido à 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.

#### **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"

### Interpretação dos resultados

Resultado	Interpretação de um resultado único
Menor que 10	Negativo – indica não evidência de uma infecção recente por Chlamydia <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 Chlamydia, uma segunda amostra deve ser obtida 7-14 dias mais tarde, e as amostras pareadas devem ser testadas simultaneamente, procurando-se pela soroconversão.
10 ou maior	Positiva – Indica uma infecção primária recente a Chlamydia

Resultado da amostra aguda	Resultado da amostra de convalescência	Interpretação de resultados de amostras pareadas
Menor que 10	Menor que 10	Não parece ser uma infecção aguda por Chlamydia  <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 10	10 ou Maior	Grande suspeita de uma infecção primária por Chlamydia, a não ser que o indivíduo tenha recebido recentemente um anticorpo passivo.

### Limitações do procedimento

- Os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos IgM anti-Chlamydia devem ser utilizados em conjunto com informações disponíveis através da avaliação clínica e outras informações diagnósticas.
- A presença de Fator Reumatóide (FR) no soro pode causar uma reação falso positiva se uma IgG específica estiver presente. Testes para FR rotineiros podem não ser sensíveis o suficiente para detectar pequenas quantidades de FR que existem em taxas normais, mas que podem ser suficientes para causar uma reação falso positiva nas técnicas de IFI<sup>21,22,23</sup> mais sensíveis. Portanto, todos os soros devem ser tratados por cromatografia de troca iônica<sup>24</sup> ou imunoprecipitação da IgG<sup>25,26</sup> antes de serem testadas para eliminar a possibilidade de interferência por FR.
- Quando houver presença de altos títulos de IgG específica no soro do paciente, poderá ocorrer competição com a IgM específica ao patógeno pelos sítios antigênicos, resultando em uma reação falso negativa para IgM<sup>21,22,23</sup>. Portanto, todos os soros devem ser tratados por cromatografia de troca iônica<sup>24</sup> ou imunoprecipitação de IgG<sup>25,26</sup> antes de ser testado para evitar esse possível problema.
- Dois métodos como a imunoprecipitação e a cromatografia de troca iônica têm sido comumente utilizados para neutralizar e remover possíveis interferências de anticorpos IgG antes do teste para pesquisa de IgM específicas em testes de IFI. A imunoprecipitação neutraliza todas as classes de IgG enquanto não afeta os níveis de IgM; entretanto, altos níveis de IgG podem necessitar de um tratamento com aumento proporcional da quantidade de reagente de precipitação. A cromatografia de troca iônica somente irá eliminar as subclasses 1,2 e 3 da IgG, sendo que a subclasse 4 (geralmente menos de 5% da IgG total) permanece junto com a IgM. Além disso, somente uma porção de anticorpos IgM pode ser recuperado<sup>37</sup>.
- Um resultado negativo não necessariamente descarta uma infecção ativa ou recente. A amostra pode ter sido coletada muito no início da doença antes da presença detectável dos anticorpos; ou ter sido coletada muito no final da doença após os níveis de anticorpos não serem mais detectáveis.
- Resultados 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.

8. A presença de anticorpos antinucleares (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-Chlamydia exibem coloração em 10-50% das células<sup>22</sup>.
9. Fluorescência citoplasmática na maioria das células podem ser devido à 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.
10. 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.
11. Se em ambos os controles positivo e negativo as células do substrato não forem visualizadas quando observadas ao microscópio de fluorescência, é necessário mudar ou realinhar a fonte de luz e checar os filtros específicos.
12. As lâminas contendo como substrato uma cultura de células pode apresentar uma fluorescência inespecífica devida a uma contaminação do anticorpo, ou da solução de Lavagem/rinsagem PBS com bactérias ou fungos. É muito importante que o corpo técnico responsável pela leitura das lâminas possua experiência em microscopia de fluorescência.
13. Devido à possibilidade de contaminação do cordão umbilical com IgM materna, é prudente se fazer à confirmação da presença de IgM em uma nova amostra colhida da criança, de preferência 5 dias após o nascimento<sup>31</sup>.
14. Sorologia para IgM realizada por IFI é bastante atrativa já que combina especificidade com sensibilidade e em muitos casos apenas uma amostra de soro é requerida. Contudo, a necessidade de uma interpretação cautelosa do significado do teste positivo para IgM em relação a clínica do paciente deve ser enfatizado. É essencial ter consciência do entendimento dos vários problemas associados com o teste da IgM evitando muitas armadilhas que podem apanhar o mais experiente dos técnicos. Resultados de IgM devem ser interpretados com cuidado.

#### Limitações específicas para o teste de Chlamydia

1. Até o momento 15 sorotipos de *C. trachomatis* foram identificados e caracterizados<sup>25,26,27</sup>. Os sorotipos A, B e C são geralmente associados com tracoma hiperendêmico; de D a K associados com doenças oculogenitais, e L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> são sorotipos do Linfogranuloma venéreo<sup>27</sup>.
2. A inter-relação entre os sorotipos tem sido identificada, e sabe-se que o tipo L<sub>1</sub> (LGV-7) reage cruzadamente com os sorotipos L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>; assim como uma menor reatividade cruzada com D, E Ba e K<sup>25,27</sup>.
3. O teste de Chlamydia IFI com a inclusão de toda a Chlamydia como substrato é capaz de ambos os grupos (gênero) e os tipos específicos de anticorpos IgG e IgM anti-*C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae*.
4. O sorodiagnóstico é útil no Linfogranuloma venéreo. Entretanto, menos de 90% dos homens que pertencem clinicamente as DSTs, são reportados como tendo anticorpos IgG para Chlamydia na época do diagnóstico. Muitos estudos indicam que as mulheres possuem níveis absolutos altos de anticorpos assim como alta taxa de soropositividade. Estudos têm demonstrado que 99% das mulheres com infecção ativa por Chlamydia apresentam níveis de anticorpos IgG detectáveis<sup>27</sup>.
5. Diagnóstico significativo de um único título alto de anticorpos anti-chlamydia de qualquer imunoglobulina tem um valor questionável devido à tendência de muitos pacientes de clínicas de DST terem apresentado anticorpos para *C. trachomatis*<sup>26</sup>.
6. Indivíduos com infecções sistêmicas apresentam altos níveis de anticorpos comparados com as infecções superficiais da membrana das mucosas. Níveis elevados de anticorpos aparecem em pacientes com Linfogranuloma venéreo<sup>27</sup>.
7. Muitas infecções por Chlamydia são assintomáticas ou com o mínimo de sintomatologia. A falta de um começo abrupto dos sintomas geralmente resulta que o paciente só vá realizar o exame quando os anticorpos IgM não podem ser identificados devido ao aumento ou diminuição dos níveis de IgG<sup>28</sup>.

#### Valores esperados

Os anticorpos IgM não aparecem na população normal.

Foi realizado um estudo com 1231 amostras de soros humanos de diferentes grupos que foram testados para a pesquisa de anticorpos anti-Chlamydia utilizando a técnica de IFI e os seguintes resultados foram obtidos. No grupo de 193 homens com uretrite gonocócica (NGU) e isolamento de Chlamydia positivo, 38 (20%) apresentaram títulos de 128-1024, 104 (54%) títulos de 16-64 e 51 (26%) títulos menores que 8.



No grupo de 394 homens com NGU e isolamento de Chlamydia negativo, 66 (17%) apresentaram título de 128-1024, 154 (39%) títulos de 16-64 e 126 (82%) títulos menores de 8. Das 152 amostras do grupo.

Controle, 2(1%) apresentaram título de 128-1024, 24 (16%) títulos de 16-64 e 126 (83%) títulos menores de 8<sup>36</sup>.

No grupo de 58 mulheres e isolamento de Chlamydia positivo, 27 (47%) apresentaram títulos de 128-1024, 24 (41%) títulos de 16-64 e 7 (12%) títulos menores que 8. No grupo de 91 homens com NGU e isolamento de Chlamydia negativo, 21 (23%) apresentaram título de 128-1024, 284 (31%) títulos de 16-64 e 42 (46%) títulos menores de 8. Das 160 amostras do grupo controle, 15 (8%) apresentaram título de 128-1024, 48 (26%) títulos de 16-64 e 120 (66%) títulos menores de 8<sup>29</sup>.

Em adição, em 160 crianças com idade de 1 a 15 anos, 0% apresentaram títulos de 128-1024, 6 (4%) títulos de 16-64 e 154 (96%) títulos menor que 8<sup>36</sup>.

Alguns estudos utilizando imunofluorescência tem identificado títulos de anticorpos na faixa de 1:8 a 1:256 em pacientes com infecções do trato genital tipo uretrite e cervicite. Homens com uretrite gonocócica que foram originalmente soronegativos, mas que mais tarde desenvolveram anticorpos IgG apresentam títulos entre 1:8 e 1:32 em 60% dos casos avaliados, e entre 1:64 e 1:256 em 40%. Altos títulos de anticorpos em adultos (1:256 ou maior) têm sido reportado em mulheres com salpingite; altos títulos (1:1024 ou maior) tem sido encontrado em adultos com Linfocitoma venéreo<sup>35</sup>

### **Características Específicas de Desempenho**

As lâminas contendo o antígeno de Chlamydia da BION foram avaliadas para a presença do antígeno de Chlamydia específico utilizando anti-soros monoclonais comerciais. Uma reação positiva foi identificada com a cultura de células infectadas quando corada pelo anti-soro correspondente<sup>30</sup>. Além disso, não ocorre reatividade cruzada com outros anti-soros monoclonais e o antígeno de Chlamydia<sup>31</sup>.

Cada laboratório deve determinar seus próprios 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. 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.
8. Sawicki L. Lab. Management, 18:42-47, 1980
9. Schachter J, Dawson CR. PSG Publishing Co., Inc. Littleton, MA, 1978.
10. Holmes KK et al. N. Engl. J. Med., 292: 1119-11206, 1975
11. Bowie WR et al. J. Clin. Invest., 59: 735-742, 1977
12. Schachter J et al. Am. J. Obst. Gynecol., 123:753-757,1975
13. Treharne JE et al. Gr. J. Vener. Dis., 55(1):26-29,1979
14. Swartz SL, Kraus SJ. J. Infect. Dis.,140(4):614-617,1979
15. Frommell GT eta l. J. Pediatr., 95(1):28-32,1979.
16. Beem MO, Saxon E. N. Engl. J. Med., 296:306-310, 1977
17. Hammerschlag MR et al. Pediatrics, 64:142-148,1979
18. Richmond SJ, Caul EO. J. of Clin. Micro, 1(4):345-352,1975
19. Weller TH, Coons AH. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 86:789-794,1954.
20. Riggs JL et al. Am. J. Pathol., 34:1081-1097, 1958
21. Hermann KL. IgM determinations, in Clinical Virology Manual Spector, S. GJ Lancz (eds), Elsevier, New York, 219-228, 1980
22. Chantler S, Diment JÁ. In Immunoassay for the 80's, Voller A, et al (eds), University Park Press, Baltimore, 417-430, 1981
23. Gardner PS, McQuillin J. Butterworth, Boston, 259-287, 1980
24. Johnson RB and Libby R. J. Clin. Micro, 12:451-454, 1980



25. Gispen R et al. Clin. Exp. Immunol., 22:431-437, 1975
26. Joassin L and Reginster M. J. Clin. Microbiol., 23:576-581, 1986
27. Ascher M. Manager, Microbiology, Immunology, Virology Laboratories< Elmhurst Memorial Hospital, Eimhurst, Illinois, Personal Communication
28. Lyerla HC, Forrester FT. , The Immunofluorescence (IF) Test, in: Immunofluorescence Methods in Virology, USDHHS, Georgia, 71-81,1979
29. Holborow EJ, et al. Br. Med. J., 11:732-734, 1957
30. Berg PA et al. Immunol., 17:281-293, 1969
31. Schimidt NJ. Clinical Immunology Newsletter, 4(6): 81-85, june, 1984
32. Wang SP. Holmes KK, P-A Mardh et al (eds), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 301-316, 1982.
33. Mardh P-A Holmes KK, P-A Mardh, PF Sparling, PJ Wiesner (eds), McGraw-Hill, New York, 829-856, 1984
34. Schachter J. Holmes KK, P-A Mardh, PF Sparling, PJ Wiesner (eds), McGraw-Hill, New York, 243-257, 1984
35. Stam WE, Holmes KK. Holmes KK, P-A Mardh, PF Sparling, PJ Wiesner (eds), McGraw-Hill, New York, 258-270, 1984
36. Saikku P, Paarronen J. J. Clin. Micro., 8:119-122, 1978
37. 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**