

**1. Uso Previsto**

Il test dell'antigene della Chlamydia è finalizzato alla diagnosi in vitro per il rilevamento rapido e di qualità della Chlamydia, effettuato direttamente su striscio endocervicale per le donne e su striscio uretrale e campioni di urina per gli uomini.

**2. Introduzione**

Al genere della Chlamydia appartengono tre specie: Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae (1), agente patogeno sostanzialmente umano, e Chlamydia psittaci, agente patogeno sostanzialmente animale. La Chlamydia trachomatis comprende 15 sierotipi noti, correlati con le infezioni urogenitali ed il linfogranuloma venereo (LGV). Le infezioni da Chlamydia trachomatis sono le patologie batteriche a trasmissione sessuale più diffuse. Ogni anno negli USA si manifestano circa 4 milioni di nuovi casi, laddove si tratta principalmente di cervicite e uretrite non gonorroica (8). Questo organismo provoca altresì infami ammazioni congiuntivali e polmonari nei bambini (2, 4-7). Le infezioni da Chlamydia trachomatis presentano un grado di prevalenza nonché un tasso di trasmissione asintomatica elevati, spesso con complicanze gravi nelle donne e nei neonati.

Tra le complicanze delle infezioni da Chlamydia nelle donne figurano cervicite, uretrite, endometriosi, annessite e una ricorrenza elevata di gravidanze ectopiche e infertilità. Una trasmissione verticale della malattia alla nascita, dalla madre al neonato, può essere causa di congiuntivite da inclusi e infami ammazione polmonare (8). Negli uomini almeno il 40% di tutti i casi di uretrite non gonorroica è da ricondursi a infezioni da Chlamydia ed epididimite (6). Circa il 70% delle donne con infezioni endocervicali e fino al 50% degli uomini con infezioni uretrali sono sintomatici (8). Le infezioni da Chlamydia psittaci sono correlate con patologie respiratorie in persone entrate in contatto con volatili infetti e non si trasmettono da persona a persona. La Chlamydia pneumoniae, isolata per la prima volta nel 1983, è correlata con infezioni respiratorie e infami ammazione polmonare (2). Le infezioni da Chlamydia vengono diagnosticate comunemente rilevando la presenza della stessa all'interno di cellule di coltura tissutale della Chlamydia o mediante tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction, amplificazione genica, N.d.T.). Il metodo colturale è, insieme alla PCR, il metodo di laboratorio più sensibile e più specifici; tuttavia, è anche laborioso, costoso e richiede tempo (2-3 giorni) e nella maggior parte delle istituzioni non è regolarmente disponibile (2, 3, 7). I test diretti, quale il test in immunofluorescenza (IFA), richiedono una strumentazione speciale e un operatore esperto per interpretare i risultati.

**3. Principio del Test**

Il test dell'antigene della Chlamydia è un test veloce immunocromatografico. La procedura prevede il prelievo di un campione clinico e il suo inserimento in una provetta per estrazione con la soluzione reagente A. Dopo 2 minuti viene aggiunta nella provetta la soluzione reagente B. Dopo l'estrazione vengono versate nella cavità per campioni della confezione per test 3 gocce (circa 120 µl) di campione estratto. Nel test la membrana è stata rivestita sulla linea del test con uno strato di anticorpi monoclonali specifici per l'antigene e sulla linea di controllo con anti-coniglio (di origine caprina). Nel corso del test gli antigeni eventualmente presenti reagiscono con l'anticorpo monoclonale marcato in oro e si spostano quindi per capillarità lateralmente sulla membrana. Se il campione contiene antigeni della Chlamydia, sulla membrana nella zona della fascia del test si forma una linea colorata composta da un complesso specifico costituito da anticorpi-Chlamydia- anticorpi-particelle d'oro. Se non è presente alcun antigene della Chlamydia, nella zona della fascia di controllo comparirà soltanto una linea rosa. A scopo di controllo della procedura nella zona di controllo compare sempre una linea colorata, indipendentemente dalla presenza della Chlamydia.

**4. Reagenti e Materiali Forniti**

- 20 confezioni per test per ogni kit
- Soluzione reagente A: in boccetta contagocce di plastica; contiene 0,2 M di idrossido di sodio (7 ml).
- Xi: irritante; R 36/38 irrita gli occhi e la pelle.
- Soluzione reagente B: in boccetta contagocce di plastica; contiene 0,2 M di acido cloridrico (7 ml).
- Provetta per estrazione e tappo: 20 pezzi per kit
- Supporto di plastica
- Foglietto illustrativo: 1 per kit
- Materiale supplementare in dotazione in conformità alla direttiva 93/42/CEE: tamponi sterilizzati con punta di Dacron (CE0482): 20 pezzi per kit

**Disponibili su richiesta:**

- spazzoline citologiche per un prelievo ottimale di strisci cervicali
- tamponi speciali per strisci uretrali

**5. Altri materiali necessari**

- cronometro
- per i campioni di urine: provette di raccolta delle urine, pipetta monouso e centrifuga
- per strisci uretrali: tamponi speciali.

**6. Conservazione e stabilità**

Conservare il kit per test a temperatura ambiente (da +2 a +30°C) fino alla data di scadenza. Non congelare. La confezione per test deve essere

conservata nel sacchetto di protezione sigillato e deve essere utilizzata immediatamente dopo l'apertura del sacchetto.

**7. Avvertenze e precauzioni**

- Solo diagnostica in vitro
- Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza. Non mescolare componenti del kit provenienti da lotti diversi. Non scambiare il tappo delle boccette delle soluzioni.
- Non utilizzare confezioni per test o tamponi danneggiati.
- Non smontare la confezione per test
- Utilizzare le confezioni per test solo una volta.
- I materiali utilizzati nella confezione per test (ad es. gli anticorpi) sono potenzialmente infettivi, tuttavia non rappresentano alcun pericolo in caso di utilizzo corretto.
- Nell'ambito del prelievo del campione, della manipolazione, della conservazione e dello smaltimento del campione e dei componenti del kit è necessario procedere con la necessaria cautela. Tutti i campioni, i reagenti e i controlli devono essere manipolati alla stregua di componenti potenzialmente infettivi. Ultimo il test, è necessario smaltire i tamponi in conformità con le normative per l'interazione con materiali potenzialmente infettivi.
- La soluzione reagente A contiene idrossido di sodio (soluzione basica); la soluzione reagente B contiene acido cloridrico (soluzione acida). Qualora una delle soluzioni venga in contatto con la pelle o gli occhi, occorrerà sciacquare con acqua abbondante.
- Per le pazienti in stato di gravidanza non devono essere utilizzate spazzoline citologiche.
- Evitare contaminazioni crociate dei campioni utilizzando tamponi e provette per estrazione propri per ogni campione.
- Nei locali in cui si maneggiano campioni e reagenti del test devono essere vietati il consumo di cibo e bevande e il fumo. Per il prelievo dei campioni e per la visita è necessario indossare indumenti protettivi, quali camici da laboratorio e guanti monouso.
- Come per tutti i test diagnostici la diagnosi clinica definitiva non deve essere formulata sulla base di un unico test ma da un medico, dopo avere esaminato tutti gli esiti clinici e di laboratorio.

**8. Raccolta e preparazione del campione**

La qualità del campione è estremamente importante (8). Per provare la presenza della Chlamydia è necessaria una tecnica di prelievo del campione energica e accurata, che fornisca materiale cellulare e non solo fluidi corporei.

**Campioni cervicali**

- Utilizzare il tampone contenuto nel kit per test.
- Prima del prelievo del campione allontanare o eliminare dalla regione endocervicale il muco in eccesso con un tampone separato o un batuffolo di ovatta. Il tampone deve essere inserito nel canale cervicale, al limite dell'epitelio, fino a quando la sua punta non sia più visibile in buona parte. In tal modo è possibile prelevare cellule epiteliali altamente prismatiche o isoprismatiche, che costituiscono il serbatoio principale degli organismi della Chlamydia. Ruotare energicamente il tampone per 15 - 20 secondi, senza contaminarlo in tal modo con cellule esocervicali o vaginali.
- In alternativa i campioni endocervicali possono essere prelevati anche con una spazzolina citologica (attenzione: le spazzoline citologiche non possono essere usate con le pazienti in stato di gravidanza). Dopo avere pulito l'esocervice con un tampone di Dacron, introdurre la spazzolina citologica nel canale cervicale, fino al limite epiteliale. Lasciare in posizione per due o tre secondi, quindi ruotare la spazzolina per due giri completi ed estrarla, senza toccare la superficie vaginale in nessun punto.
- Inserire il tampone o la spazzolina citologica nella provetta per estrazione, se il test deve essere eseguito immediatamente dopo il prelievo del campione.

**Campioni uretrali**

- Per il prelievo di campioni uretrali devono essere utilizzati tamponi standard con filo metallico e punta di filo di bra oppure altri strumenti per il prelievo di campioni speciali (non compresi nella dotazione). Avvisare il paziente che non dovrà urinare per un'ora prima del prelievo.
- Inserire il tampone nell'uretra per circa 2-4 cm, ruotarlo per 3-5 secondi ed estrarlo. Introdurre il tampone nella provetta per estrazione, se il test deve essere eseguito immediatamente dopo il prelievo del campione.

**Conservazione di campioni cervicali e uretrali:**

- non inserire il tampone in un contenitore di trasporto con mezzo, in quanto il mezzo di trasporto impedisce il test; inoltre, la vitalità degli organismi non è necessaria per il test. Se il test non può essere eseguito immediatamente dopo il prelievo del campione, i campioni del paziente devono essere inseriti in una provetta di trasporto asciutta per la conservazione o per il trasporto.
- I tamponi possono essere conservati per 4 ore a temperatura ambiente (da 15 a 30°C) per 24 ore in ambiente refrigerato (da 2 a

8°C). Non congelare. Tutti i campioni devono raggiungere una temperatura ambiente di 15-30°C prima dell'esecuzione del test.

## Campioni di urina maschile:

- Invitare il paziente a depositare in un contenitore sterile (non contenuto nel kit), senza mezzo di conservazione, almeno 20-40 ml di urina fresca. I campioni della prima urina del mattino contengono la massima concentrazione di Chlamydia e, di conseguenza, sono da preferirsi quale materiale per il campione.
- Qualora i campioni di urina non debbano essere sottoposti immediatamente al test, possono essere conservati raffreddati (2-8 °C) per 24 ore.

## 9. Procedura del Test

### Estrazione dei campioni

#### 1. Trattamento dei campioni endocervicali o uretrali

- Inserire una provetta per estrazione pulita debitamente contrassegnata nel supporto di plastica. Versare 5 gocce di soluzione reagente A nella provetta per estrazione.
- Immergere il tampone o la spazzolina del/della paziente nella provetta per estrazione e lasciare agire a temperatura ambiente per 2 minuti. Nel frattempo fare rotolare il tampone o la spazzolina con movimenti circolari contro la parete della provetta per estrazione, in maniera tale da spremere dal tampone o dalla spazzolina il liquido e da poterne assorbire di nuovo.
- Al termine del tempo di estrazione, aggiungere 5 gocce di soluzione reagente B e miscelare la soluzione con il tampone o con la spazzolina. Successivamente, premere con forza il tampone o la spazzolina contro la provetta per estrarre dal tampone o dalla spazzolina tutto il liquido possibile. Smaltire il tampone o la spazzolina in conformità con le normative vigenti per materiali infettivi. I campioni estratti possono essere conservati per 60 minuti a temperatura ambiente, senza compromettere gli esiti del test della Chlamydia.

#### 2. Trattamento dell'urina maschile

- I campioni di urina devono essere centrifugati per concentrare tutte le particelle che possono contenere cellule di Chlamydia. Centrifugare l'urina (almeno 15 ml) a 10.000 giri/min. per 10 minuti.
- Drenare accuratamente il residuo ed aggiungere 5 gocce di soluzione reagente A alla provetta, rimettere in sospensione l'agglomerato con una pipetta monouso ed incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
- Con una pipetta monouso trasferire la sospensione nella provetta per estrazione, aggiungere 5 gocce di soluzione reagente B e miscelare (ad es. sollevando più volte la soluzione con una pipetta). Il campione può ora essere introdotto nella confezione per test senza ulteriori tempi di incubazione.
- Attenersi alle istruzioni fornite nel foglietto illustrativo.
- Prima dell'apertura del sacchetto protettivo, portare la confezione per test a temperatura ambiente.
- Estrarre dal sacchetto protettivo il test dell'antigene della Chlamydia e adagiare su una superficie pulita, asciutta e piana. Contrassegnare la confezione per test quale campione del paziente o campione di controllo.
- Applicare il tappo sulla provetta per estrazione.
- Versare 3 gocce (ca. 120µl) del campione estratto dalla provetta per estrazione nel pozzetto circolare della confezione per test contrassegnato con la lettera S.
- Attendere fin non alla comparsa delle linee colorate di rosa. L'esito del test dovrebbe essere letto entro 15 minuti, dopo avere aggiunto la sospensione estratta al campione. A seconda della concentrazione degli organi della Chlamydia sul tampone alcuni esiti sono visibili già dopo 1 minuto. Tuttavia a conferma degli esiti negativi è necessario attendere l'intero tempo di reazione di 15 minuti. Dopo 20 minuti gli esiti non devono più essere valutati.

## 10. Interpretazione dei risultati



**Negativo:** una linea colorata compare solo nella zona della fascia di controllo. Nella zona della linea del test non compare alcuna fascia rossa. Ciò significa che non è stata rilevata la presenza di alcun antigene della Chlamydia o che la quantità di antigene della Chlamydia è inferiore al limite rilevabile.



**Positivo:** in aggiunta alla linea di controllo compare anche una linea rossa nella zona del test. Ciò significa che il campione contiene l'antigene della Chlamydia.

**Non valido:** se non compare alcuna linea di controllo, il test non è valido. Probabilmente il test non è stato eseguito correttamente e deve essere ripetuto con una nuova confezione per test. A tale scopo è possibile prelevare un campione fresco o utilizzare un campione dell'agglomerato di estrazione residuo.

## 11. Controllo di qualità

- Il test dell'antigene della Chlamydia prevede un controllo della procedura. Una linea di colore rosa nella zona di controllo della membrana è indice di esecuzione del test regolare e di reagenti reattivi.
- Una buona prassi di laboratorio prevede l'adozione di controlli esterni, per assicurare l'adeguata prestazione del kit. Per ogni lotto devono essere condotti due controlli commerciali. I due controlli dovrebbero consistere in un controllo negativo e in uno positivo con un contenuto minimo di Chlamydia. Con l'ausilio del controllo positivo debole si garantisce che il test non sia stato influenzato svantaggiosamente e che la presenza della Chlamydia sia stata comprovata con la sensibilità dichiarata per il sistema di test. Per questo scopo si raccomanda l'uso dei controlli positivi e negativi che devono essere utilizzati e manipolati secondo le informazioni fornite dal produttore.

## 12. Limiti del Test

Il test dell'antigene della Chlamydia non distingue specificamente tra *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* e *C. psittaci*. Il rilevamento della Chlamydia dipende dalla concentrazione degli organismi contenuti nel campione. Questa può essere influenzata dai metodi con i quali il campione viene prelevato e da fattori propri del paziente quali età, storie precedenti di patologie trasmesse sessualmente, sintomi in atto, ecc.

## 13. Performance

### Sensibilità

Per stabilire la sensibilità analitica del test dell'antigene della Chlamydia sono stati esaminati campioni contenenti diversi tipi di Chlamydia. La soglia di rilevamento del test dell'antigene della Chlamydia è stata fissata a 1,0 x 10<sup>5</sup> agenti patogeni per test.

### Specificità

La miscela di anticorpi utilizzata nel test dell'antigene della Chlamydia è mirata verso un epitopo specifico del genere, che è presente in tutte le 15 sierovarietà della Chlamydia. In aggiunta sono stati esaminati anche rami di Chlamydia psittaci e di Chlamydia pneumoniae con il test dell'antigene della Chlamydia, ottenendo un esito positivo. La reattività incrociata con altri organismi è stata esaminata con sospensioni di 10<sup>7</sup> CFU/mL di material campione. La presenza dei seguenti organismi non è stata rilevata con il test dell'antigene della Chlamydia:

Acinetobacter calcoaceticus	Proteus vulgaris
Salmonella typhi	Acinetobacter spp.
Staphylococcus aureus	Candida albicans
Neisseria catarrhalis	Neisseria gonorrhoea
Neisseria meningitidis	Neisseria lactamica
Escherichia coli	Gardnerella vaginalis
Streptococcus faecalis	Streptococcus faecium
Pseudomonas aeruginosa	Trichomonas vaginalis

## 14. Bibliografia

- 1) Grayston, J.T. et al., N. Engl. J. Med. 315:161, 1986.
- 2) Barnes, R., Clin. Microbiol. Rev. 2:119, 1989.
- 3) Kellogg, J.A., Arch. Pathol. Lab. Med. 113:453, 1989.
- 4) Schachter, J., N. Engl. J. Med. 13:105, 1978.
- 5) Schachter, J., Chlamydiae, p.1045ff, Manual of Clinical Microbiology, 5th ed, ASM, Washington, 1991.
- 6) Schachter, J. & Dawson, C.R., Sex. Transm. Dis. 8:167, 1981.
- 7) Stamm, W.E., Ann. Intern. Med. 108:710, 1988.
- 8) CDC. Morbid.Mortal. Weekly Rep. 34(suppl 3-s): 535, 1985.