



FIGURE 1: CHLAMYDIA CEL PN DIAGRAM FOR USE

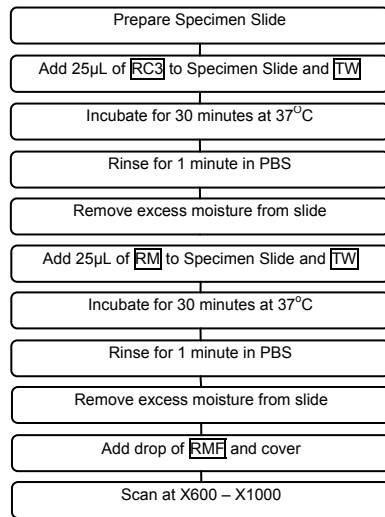


TABLE 1: SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE CHLAMYDIA CEL PN
 TABLEAU 1: SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ ET AUTRES DONNÉES DU TEST CHLAMYDIA CEL PN
 TABELLE 1: SENSIBILITÄT, SPEZIFIZITÄT UND ANDERE DATEN ZUM CHLAMYDIA CEL PN
 TABELLA 1: SENSIBILITÀ, SPECIFICITÀ ED ALTRI DATI SULLA CHLAMYDIA CEL PN
 TABLA 1: SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y OTROS DATOS DEL CHLAMYDIA CEL PN
 TABELA 1: SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, & OUTROS DADOS DO CHLAMYDIA CEL PN
 TABELA 1: CZUŁOŚĆ, SWOISTOŚĆ I INNE DANE NA TEMAT ZESTAWU CHLAMYDIA CEL PN

Trial	Sensitivity	Specificity	Repeatability	Reproducibility
Essai	Sensibilité	Spécificité	Répétabilité	Reproductibilité
Versuch	Sensitivität	Spezifität	Wiederholpräzision	Reproduzierbarkeit
Prova	Sensibilità	Specificità	Ripetibilità	Riproducibilità
Prueba	Sensibilidad	Especificidad	Repetibilidad	Reproducibilidad
Teste	Sensibilidade	Especificidade	Repetição	Reprodutibilidade
Próba	Czułość	Swoistość	Powtarzalność	Odtwarzalność
A	100%	100%	-	-
B	-	-	100% Correlation	100% Correlation
<p>Not cross reactive with / Pas de Réaction Croisée avec / Keine Kreuzreaktionen mit / Non mostra reazione crociata con / No muestra reacción cruzada con / Sem reacção cruzada com / Brak reakcji krzyżowej z: <i>Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Beta haemolytic Streptococcus group A, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Bacteroides fragilis, Viridans Streptococcus, Candida albicans, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci, Respiratory Syncytial Virus, Adenovirus, Parainfluenzae type 3, Influenzae type B, Cytomegalovirus</i></p>				

EXPLANATION OF SYMBOLS



Consult Instructions for Use
 Consulter le Mode d'Emploi
 Gebrauchsanweisung
 Consultare le istruzioni per l'uso
 Consultar el manual de instrucciones
 Consultar o Folheto de Instruções
 Zapoznać się z instrukcją użycia



In Vitro Diagnostic Medical Device
 Produit Diagnostique Médical In Vitro
 In-vitro-Diagnostika
 Diagnostico in vitro Dispositivo medico
 Producto Sanitario para Diagnóstico In Vitro
 Produto de Diagnóstico Médico In vitro
 Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Temperature Limitation
 Températures Limites
 Temperaturbegrenzung
 Temperatura limite
 Limite de temperatura
 Temperatura Limitada
 Ograniczenia temperatury



Biological Risks
 Risques Biologiques
 Biogefährdung
 Rischio biologico
 Riscos Biológicos
 Ryzyko biologiczne



Manufacturer
 Fabricant
 Hersteller
 Fabricante
 Fabricante
 Fabricante
 Producent

Cellabs Pty Ltd
 Unit 7, 27 Dale Street (PO Box 421)
 Brookvale, NSW 2100 Australia
 Tel: +61 2 9905 0133 Fax: +61 2 9905 6426
 Web: http://www.cellabs.com.au
 Email: sales@cellabs.com.au



LC3.12 - PDF
 4th December 2006



Authorised Representative in the EC
 Représentant Autorisé dans la EC
 Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
 Rappresentante Autorizzato nella EC
 Representante autorizado en la EC
 Representante Autorizado na CE
 Autoryzowany przedstawiciel w UE

Insert Version
 Manuel Version
 Fassung der Packungsbeilage
 Versione Inserto
 Versión del manual de instrucciones
 Versão do folheto de Instruções
 Ulotka opakowania



CHLAMYDIA CEL PN

INTENDED USE AND PRINCIPLE OF THE TEST

The Chlamydia Cel Pn If Test is an *in vitro* indirect immunofluorescence test for the direct detection of *Chlamydia pneumoniae* organisms in clinical specimens. A monoclonal antibody to *C. pneumoniae* binds specifically to the organisms present in fixed specimens and a second antibody, FITC-conjugated goat anti-mouse Ig, stains the *C. pneumoniae* organisms.

CONTENTS OF THE KIT

	KC3 Demo	KC3 Standard	Bulk
RC3 Chlamydia Cel Pn Mab Reagent	0.25mL	1.25mL	5mL
RM Anti-mouse Ig-FITC Reagent	0.25mL	1.25mL	5mL
TW Positive Control Slide (Single Use only)	1	1	-
RMF Mounting Fluid	2.5mL	2.5mL	-
	<i>Tests</i>	<i>10</i>	<i>50</i>
		<i>50</i>	<i>200</i>

Materials are supplied ready for use. Store at 2-8°C. Expiry dates are clearly marked on each kit component and the box. Expiry dates do not change once opened.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Microscope slides with 6-8mm diameter wells; precision pipette for delivering 25µL; acetone or methanol for specimen fixation; humid chamber; wash bath; phosphate buffered saline (PBS) for washing step; cover slips; non-fluorescing immersion oil; and fluorescence microscope with filter system for FITC (maximum excitation wavelength 490nm, mean emission wavelength 530nm) and x600-x1000 magnification.

PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only. Do not use after the expiry date shown on the label. If protective packaging is damaged, contact your local distributor and ask for a replacement. Do not mix components from different kits. The Chlamydia Cel Pn Mab Reagent and Anti-mouse Ig-FITC Reagent have been optimised for use with Cellabs Positive Control Slide and Mounting Fluid. Evans Blue dye contained in the anti-mouse Ig-FITC reagent is a possible carcinogen, therefore avoid contact with the skin. Patient specimens and the positive control slide should be handled as though potentially infectious. A Positive Control Slide must be run with each test run. Refer to Material Safety Data Sheet (MSDS) for further information.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION OF SLIDES

THROAT SWABS: Insert swab in the posterior nasopharynx and collect specimen. The swab may be smeared onto a slide and fixed in acetone or methanol (acetone preferred) for 5 minutes and allow to air dry. Another option is to place the swab in 0.5mL of Chlamydia transport medium (see below for recipe). Cut the swab shaft and leave swab submerged. Vortex the swab for 10 seconds and place 25µL on slide and fix in methanol for 5 minutes.

Chlamydia Transport Medium: 68.46g sucrose, 2.09g K₂HPO₄, 1.09g KH₂PO₄, Streptomycin 50 µg/mL, Vancomycin 100 µg/mL, and Fungizone 5 µg/mL. Dissolve sucrose, K₂HPO₄, and KH₂PO₄ in distilled water to 1 litre and autoclave at 115°C for 15 minutes. Add STERILE antibiotic solutions when cool. Store at or below 2-8°C.

NASOPHARYNGEAL ASPIRATES (NPA) & BRONCHOALVEOLAR LAVAGES (BAL): Place 20µL of unwashed NPA specimen on a single well slide, dry and fix in methanol or acetone for 5 minutes. Spin BAL or washed NPA specimens in a microfuge at 12000g for 5 minutes and discard the supernatant. Resuspend the pellet in 100 - 500 µL PBS or transport medium and place 20µL on slide. Dry and fix PBS suspensions in methanol or acetone for 5 minutes, and transport medium suspensions in methanol for 5 minutes. Fix cultures grown in plastic trays or bottles in methanol for 5 minutes, as acetone will affect the plastic.

INDUCED SPUTUM SAMPLES: Vortex 2-3mL sputum with the same volume of 0.3% dithiothreitol, then incubate for 5-10 minutes at 37°C. Incubate for 30-60 minutes if specimen is too viscous. Add an equal volume of PBS, vortex, and then centrifuge at 12000g for 10 minutes (or 2000g for 30 minutes). Discard supernatant and resuspend pellet in 500 µL PBS. Place 25µL on slide and fix in methanol or acetone for 5 minutes.

If the fixed specimens are not tested immediately store at 2-8°C overnight or freeze at -20°C for up to 2 months.

INSTRUCTIONS FOR USE

1. Add 25µL of the **RC3** to the fixed specimen and **TW**, covering well area.
2. Incubate the slides at 37°C in a moist chamber for 30 minutes. Do not allow the slides to dry as this may cause non-specific binding.
3. Rinse gently in a bath of PBS for about one minute.
4. Drain slide and remove excess moisture around the well with a tissue.
5. Add 25µL of the **RM** to the specimen and **TW**.
6. Repeat Steps 2 - 4.
7. Add a drop of **RMF** to the slide well. Place a coverslip on top of the drop and remove air bubbles.
8. Scan the entire specimen well using a fluorescence microscope under oil immersion at X600-X1000 magnification. Read immediately or store at 2-8°C in the dark for up to 24 hours.

READING AND INTERPRETATION OF RESULTS AND DIAGNOSIS

The most common chlamydial forms in specimens are extracellular EB's. These appear as bright apple-green fluorescent pin-point, smooth-edged disc shaped bodies (approximately 300nm in diameter) and can be seen against a background of reddish-brown counterstained cells. Reticulate bodies may also be observed. These are 2-3 times larger than the EB's and they either fluoresce evenly or possess dark centres with a halo of fluorescence. If inclusions are present their appearance will be similar to those in the positive control slide, i.e., a mass of EB's and RB's within an enclosing membrane adjacent to the host cell nucleus. Any material which can be distinguished from chlamydial forms or fluoresce other than apple-green should be disregarded. The control slide should be used for comparison with the appearance and size of EB's found in the specimen. A positive diagnosis can be made when fixed stained specimens show at least four or more chlamydial EB's. A negative diagnosis can be reported when fixed stained smears are free of chlamydial organisms but cells are present. These cells may be intact or ruptured columnar cells. Irregularly shaped fluorescent material that differs in size from chlamydial bodies described above or fluoresces white, red or yellow should be considered non-specific staining.

WASTE DISPOSAL

Dispose of any unused components as biohazardous waste. Where the anti-mouse Ig-FITC reagent has been disposed of in the sink, ensure it is flushed with large quantities of water (as the sodium azide it contains may react with copper/lead plumbing systems). For more information, please refer to the MSDS.

SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE CHLAMYDIA CEL PN

Refer to summary table at end of insert. All data on the Chlamydia Cel Pn can be obtained in the product information sheet. Please ask your local distributor or contact Cellabs.

INDEMNITY NOTICE

Modifications or changes made in the recommended procedure may affect the stated or implied claims. A positive or negative result does not preclude the presence of other underlying causative agents. Cellabs and its agents and distributors shall not be liable for damages under these circumstances.

CHLAMYDIA CEL PN

PRZEZNACZENIE I ZASADY WYKONANIA TESTU

Test Chlamydia Cel Pn If jest testem *in vitro* przeznaczonym do bezpośredniego wykrywania bakterii Chlamydia pneumoniae w próbkach klinicznych, za pomocą metody immunofluorescencji bezpośredniej. Przeciwciała monoklonalne przeciwko C.pneumoniae wiąże się swoiście z drobnoustrojami obecnymi w utrwalonej próbce, a drugie przeciwciała, anti-mysia Ig kozia znakowana FITC, daje reakcję barwną z C.pneumoniae.

ZAWARTOŚĆ ZESTAWU

RC3	Odczynnik Chlamydia Cel Pn MAb	KC3 Demo	Standard KC3	OBJ.
RM	Anty-mysia Ig- znakowana FITC	0.25mL	1.25mL	5mL
TW	Kontrola dodatnia na szkiełku (tylko do użytku jednorazowego)	0.25mL	1.25mL	5mL
RMF	środek do utrwalania preparatu (Mounting Fluid)	1	1	-
		2.5mL	2.5mL	-
		<i>Testy</i>	<i>10</i>	<i>50</i>
				<i>200</i>

Materiały są dostarczone w postaci gotowej do użycia. Przechowywać w temperaturze 2-8°C. Data przydatności do użycia jest wyraźnie zaznaczona na każdym elemencie zestawu oraz na opakowaniu. Data ważności nie zmienia się po otwarciu.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIE DOSTARCZONE

Szkiełko mikroskopowe z dołkami o średnicy 6-8mm; nastawna pipeta o obj. 25µL; aceton lub metanol do utrwalania próbeki; mokra łaźnia; płuczka; buforowany roztwór soli (PBS) do przemywania; szkiełka nakrywkowe; niefluorujący olejek immersyjny; mikroskop fluorescencyjny z systemem filtrów do FITC (maksymalne wzbudzenie długości fali 490nm, średnia emisja długości fali 530nm) oraz powiększeniem x600-x1000.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Przeznaczone wyłącznie do diagnostyki *in vitro*. Nie używać po upływie daty ważności podanej na opakowaniu. W razie uszkodzenia opakowania zabezpieczającego, skontaktuj się z dystrybutorem lokalnym z prośbą o wymianę. Nie mieszaj odczynników z różnych zestawów. Odczynnik MAb oraz odczynnik anti-mysi Ig-FITC z zestawu Chlamydia Cel Pn zostały poddane optymalizacji z użyciem kontroli dodatniej Cellabs oraz środkiem do utrwalania preparatów (Mounting Fluid). Barwnik-błękit Evansa zawarty w odczynniku Ig-FITC anti-mysim ma właściwości rakotwórcze, dlatego należy unikać jego kontaktu ze skórą. Zarówno próbki pacjenta jak i kontrola dodatnia powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne. Zaleca się dołączanie do każdego badania próby dodatniej. Dalsze informacje znajdują się w materiałach dotyczących bezpieczeństwa stosowania (MSDS).

SPOŚÓB POBIERANIA PRÓBEK ORAZ SPORZĄDZENIA PREPARATÓW

WYMAZY Z GARDŁA: Umieścić wymazówkę w tylniej części nosogardła i pobrać próbkę. Wymaz może zostać umieszczony na szkiełku i utrwalony za pomocą acetonu lub metanolu (preferowany aceton) przez 5 minut do wyschnięcia. Innym sposobem jest umieszczenie wymazówki w 0.5mL Chlamydiomu podłożu transportowym (patrz niżej). Odlamać trzonek wymazówki i pozostawić zanurzoną. Mieszać próbkę przez 10 sekund, dodać 25µL na szkiełku i utrwalić w metanolu przez 5 minut.

Podłoże transportowe (Chlamydia Transport Medium): 68.46g sacharozy, 2.09g K₂HPO₄, 1.09g KH₂PO₄, Streptomycine 50 µg/mL, Vancomycine 100 µg/mL, i Fungizone 5 µg/mL. Rozpuścić sacharozę, K₂HPO₄ oraz KH₂PO₄ w wodzie destylowanej do objętości 1 litra i umieścić w autoklawie w temperaturze 115°C na 15 minut. Dodać STERYLNY roztwór antybiotyków po wystudzeniu. Przechowywać w temperaturze 2-8°C lub niższej.

ASPIRAT Z NOSOGARDŁA (NPA) I POPLUCZNYN OSKRZELOWO-PĘCHERYKOWE (BAL): Umieścić 20µL nieplukanej próbki NPA w pojedynczym szkiełku z dołkami, wysuszyć i utrwalić w metanolu lub acetonie przez 5 minut. Wirować BAL lub próbkę NPA w wirówce centrifugowej przy obrotach 12000g przez 5 minut i usunąć supernatant. Ponownie doprowadzić do powstania zawiesiny z osadu umieszczając go w 100 - 500 µL PBS lub w podłożu transportowym i wprowadzić 20µL na szkiełko. Wysuszyć i utrwalić zawiesinę PBS w metanolu lub acetonie przez 5 minut, a zawiesinę podłoża transportowego w metanolu przez 5 minut. W przypadku użycia plastikowych tac lub butelek utrwalać w metanolu przez 5 minut, gdyż aceton może uszkodzić plastik.

INDUKOWANE PRÓBKİ PLWOCINY: Zmieszać 2-3mL plwociny z tą samą objętością 0.3% dithiothreitolu, następnie inkubować przez 5-10 minut w temperaturze 37 °C. Jeśli próbka jest zbyt lepka, inkubować przez 30-60 minut. Dodać taką samą objętość PBS, zmieszać, a następnie odwirować przy obrotach 12000g przez 10 minut (lub 2000g przez 30 minut). Usunąć supernatant i ponownie z osadu sporządzić zawiesinę w 500 µL PBS. Umieścić 25µL na szkiełku i utrwalić za pomocą metanolu lub acetonu przez 5 minut.

Jeśli utrwalone próbki nie są testowane natychmiast, można je przechowywać w temperaturze 2-8°C przez dobę lub zamrożone w temperaturze -20°C do dwóch miesięcy.

INSTRUKCJA UŻYCIA

- Dodać 25µL **RC3** do utrwalonej próbki oraz **TW**, pokrywając całe pole.
- Inkubować szkiełko w temperaturze 37°C w wilgotnej komorze przez 30 minut. Nie dopuścić do wysuszenia szkiełko, gdyż może to spowodować nieswoiste wiązanie.
- Delikatnie przemyć w kąpeli z PBS przez około 1 minutę.
- Płyn zostawić ściec od szkiełka mikroskopowego a resztowy płyn wokolo testowego pole usunąć z pomoci szmatka.
- Dodać 25µL **RM** do próbki oraz **TW**.
- Powtórzyć czynności z punktów 2 - 4.
- Dodać kroplę **RMF** do płytki z dołkami. Umieścić szkiełko nakrywkowe i usunąć pęcherzyki powietrza.
- Objeźreć dokładnie całą próbkę za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego pod immersją w powiększeniu X600-X1000. Odczytać natychmiast lub przechowywać w temperaturze 2-8°C bez dostępu światła do 24 godzin.

ODCZYT I INTERPRETACJA WYNIKÓW ORAZ ROZPOZNIANIE

Najnowszechniejszą formą chlamydyi w próbce są zewnątrzkomórkowe EB (ciałka podstawowe). Widoczne są one jako jasnozielone świecące punkty, w kształcie krążka, o wyraźnie zaznaczonych brzegach (o średnicy około 300nm), które można zaobserwować na tle czerwonawo-brązowych niewybarwionych komórek nabłonka. Mogą być również widoczne ciałka szkiełkowane (RB). Są one 2-3 razy większe niż EB i również świecą zarówno równomiernie jak i z obecnością ciemnych pól w środku ze świecącym „halo” wokół. Wygląd wtrętów cytoplazmatycznych, jeśli są obecne, może być podobna jak w kontroli dodatniej, tj., zgromadzone EB i RB, w obrębie błony przyległej do jądra cytoplazmatycznego komórki gospodarza. Każda cząstka, która różni się od form chlamydiowych lub świeci w inny sposób niż jabłkowo-zielony powinna zostać pominięta. Płytką kontrolna powinna być używana do porównania z obecnymi w próbce formami EB pod względem wyglądu i kształtu. Wynik dodatni jest wówczas gdy w utrwalonej zabarwionej próbce widoczne są przynajmniej 4 lub więcej ciałka EB. Wynik ujemny jest wówczas gdy w barwionym, utrwalonym preparacie brak jest obecności bakterii chlamydiowych, przy jednoczesnej obecności komórek. Mogą to być komórki nierazunosej lub uszkodzone nabłonka walcowatego. Nieręgalnego kształtu elementy różniące się rozmiarem od ciałek chlamydiowych opisanych powyżej lub takie które fluoryzują na biało, czerwonو lub żółto powinny być uznane za wybarwione nieswoiście.

USUWANIE ODPADÓW

Przy usuwaniu jakichkolwiek elementów zestawu należy postępować jak z niebezpiecznymi odpadami. Jeśli odczynnik Ig-FITC anty-mysi zostanie wylany do zlewu, należy spłukać zlew dużą ilością wody (ponieważ azydek sodu, który jest składnikiem odczynnika może wchodzić w reakcję z miedzią/niłowiana instalacją wodno-kanalizacyjną). W celu uzyskania dalszych informacji należy zapoznać się z materiałami dotyczącymi bezpieczeństwa stosowania (MSDS).

CZUŁOŚĆ, SWOISTOŚĆ I INNE DANE DOTYCZĄCE ZESTAWU CHLAMYDIA CEL PN

Sprawdź w podsumowaniu umieszczonym w tabeli na końcu instrukcji. Wszystkie dane dotyczące zestawu Chlamydia Cel Pn można uzyskać w części dotyczącej informacji o produkcie. Proszę skontaktować się z dystrybutorem lokalnym lub firmą Cellabs.

OSTRZEŻENIE

Za wszelkie odstępstwa od zalecanej procedury oraz jakiegokolwiek modyfikacje firma nie ponosi odpowiedzialności. Należy wziąć pod uwagę iż wynik dodatni lub ujemny nie wyklucza obecności innych zaszadniczych czynników przyczynowych. Firma Cellabs oraz jej przedstawiciele i dystrybutorzy nie odpowiadają za szkody wynikające z tych okoliczności.

CHLAMYDIA CEL PN

PRINCIPE DU TEST ET INDICATIONS D'EMPLOI

Le coffret Chlamydia Cel Pn IF est un test rapide *in vitro* par immunofluorescence pour détecter et diagnostiquer la présence de *Chlamydia pneumoniae* directement dans les échantillons patients. Un anticorps monoclonal se lie spécifiquement aux *C. pneumoniae* de l'échantillon et un second anticorps de chèvre, conjugué FITC anti-Ig de souris se lie au premier anticorps.

COMPOSITION DU COFFRET

RC3	de Réactif Chlamydia Cel Pn MAb	KC3 Demo	KC3 Standard	Bulk
RM	de Réactif FITC anti-Ig de souris	0.25mL	1.25mL	5mL
TW	Contrôle Positif sur lame (réactif à usage unique)	1	1	-
RMF	de Liquide de Montage	2.5mL	2.5mL	-
		<i>Déterminations</i>	<i>10</i>	<i>50</i>
				<i>200</i>

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Conserver à 2-8°C. Les dates de péremption sont clairement indiquées sur chaque composant et sur l'étiquette du coffret, et ne sont pas affectées par l'ouverture du coffret.

MATERIELS REQUIS NON FOURNIS

Lames à spots diamètre 6-8 mm, pipette de 25 µL, acétone ou méthanol pour fixation des échantillons; chambre humide ; bain de lavage des lames ; tampon P.B.S. pour lavage ; lamelles couvre objets ; huile à immersion non fluorescente ; microscope à fluorescence pour FITC (490/530 nm), grossissement 600 à 1000.

PRECAUTIONS

Produit à usage uniquement *in vitro*. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Si l'emballage est abîmé, contactez votre fournisseur local pour un remplacement. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Si l'emballage est abîmé, contactez votre fournisseur local pour un remplacement. Ne pas mélanger les composants de coffrets différents. Réactif Chlamydia Cel Pn MAb et Réactif FITC anti-Ig de souris est optimisé pour l'emploi des lames de contrôle et du liquide de montage fournis par Cellabs. Le Bleu d'Evans contenu dans le Réactif FITC anti-Ig de souris est un carcinogène potentiel, donc évitez tout contact avec la peau. Les lames de contrôle positives ainsi que les échantillons patients doivent être considérés comme potentiellement infectueux. Une Lame de Contrôle Positive doit être préparée pour chaque série de tests afin d'en vérifier la qualité. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

PRELEVEMENTS DE GORGE: Introduire l'écouvillon dans le nasopharynx postérieur et collecter l'échantillon. L'échantillon peut être déposé sur une lame et fixé à l'acétone (de préférence) ou au méthanol pendant 5 minutes et finalement séché. Une autre option est de placer l'écouvillon dans 0.5 ml de milieu de transport (recette ci après). Coupez l'extrémité de l'écouvillon et plongez le dans le milieu. Agitez l'écouvillon 10 secondes au vortex et placez 25 µl sur la lame avant de fixer au méthanol pendant 5 minutes.

Milieu de Transport Chlamydia: 68.46g sucrose, 2.09g K₂HPO₄, 1.09g KH₂PO₄, Streptomycine 50 µg/mL, Vancomycine 100 µg/mL et Fungizone 5 µg/mL. Dissoudre sucrose, K₂HPO₄ et KH₂PO₄ dans 1 l d'eau distillée et autoclaver 15 minutes à 115°C. Ajouter les solutions antibiotiques STERILES à froid. Conserver à 2-8°C.

ASPIRATIONS NASOPHARYNGEES (ANP) & LAVAGES BRONCHOALVEOLAIRE (LAB): Déposer 20 µl de spécimens ANP non lavé sur le spot d'une lame à spot unique, sécher et fixer à l'acétone ou au méthanol pendant 5 minutes. Centrifuger les spécimens de BAL ou d'ANP lavés à 12000 pour 5 minutes, puis jeter le surnageant. Emulsionner le culot dans 100 - 500 µl de tampon PBS ou de milieu de transport et déposer 20 µl sur la lame. Sécher et fixer les préparations au PBS à l'acétone ou au méthanol pendant 5 minutes, et fixer les préparations au milieu de transport au méthanol pendant 5 minutes. Fixer les cultures préparées en flacons ou bouteilles plastiques au méthanol pendant 5 minutes car l'acétone réagit avec le plastique. Si les spécimens fixés ne sont pas observés immédiatement, on peut les conserver une nuit à 2-8°C ou congelés à -20°C pendant 2 mois.

ECHANTILLONS DE SPUTUM INDUITS: Agiter au vortex 2-3mL de sputum mélangé au même volume de dithiothreitol à 0,3%, puis incuber 5-10 minutes à 37 °C. Incuber 30-60 minutes si l'échantillon est visqueux. Ajouter un volume égal de tampon PBS, agiter au vortex, puis centrifuger à 12000g pour 10 minutes (ou 2000g pour 30 minutes). Jeter le surnageant et suspendre le culot dans 500 µL de PBS. Déposer 25 µL sur la lame et fixer au méthanol ou à l'acétone pendant 5 minutes.

Si les préparations ne sont pas observées immédiatement, conservez-les à 2-8 °C jusqu'au lendemain ou à -20 °C jusqu'à 2 mois.

MODE D'EMPLOI

- Déposez 25 µl de **RC3** sur le spot de la lame de **TW** ou d'échantillon patient fixé.
- Incubez les lames à 37°C en chambre humide pour 30 minutes. Ne laissez pas les lames sécher, car cela accroît le risque de marquages non spécifiques.
- Rincez les lames délicatement dans un bain de P.B.S. pendant 1 minute.
- Egouttez les lames afin d'éliminer tout liquide excessif jusqu'à ce qu'elles soient sèches.
- Déposez 25 µl de **RM** sur l'échantillon et sur **TW**
- Répétez les étapes 2 à 4 ci-dessus.
- Déposez une goutte de **RMF** sur chaque spot, puis la lamelle en évitant les bulles.
- Observez le spécimen au microscope à fluorescence sous huile à immersion à x 600 – 1000. Si l'observation est retardée, conservez les lames à l'obscurité à 2-8°C jusqu'à 24 heures.

OBSERVATION, INTERPRETATION DES RESULTATS ET DIAGNOSTIQUE

Les corps élémentaires (CE) extracellulaires représentent la forme chlamydiae la plus souvent rencontrée. Ils apparaissent comme de minuscules points vert comme, brillants, d'aspect lisse (diamètre environ 300 nm) et ils se distinguent bien sur le fond brun-rouge du contre colorant. Des corps réticulés (CR) peuvent aussi être observés. Ils sont deux à trois fois plus grands et peuvent se présenter avec un centre sombre et un halo fluorescent. Les inclusions, si présentes, apparaissent comme sur la lame de contrôle, une masse de CE et CR entourés d'une membrane et à proximité du noyau de la cellule hôte. Utilisez la lame de contrôle à titre de comparaison pour vérifier l'apparence et la taille des CE des échantillons. Un diagnostic positif est confirmé lorsque vous observez au moins 4 corps Chlamydiae élémentaires. Le résultat est négatif quand aucun organisme chlamydiae n'est observable en la présence de cellules. Tout élément fluorescent de taille ou de forme différente de celle des *Chlamydia*, ou fluorescent de couleur blanche, rouge ou jaune doit être considéré comme un marquage non spécifique.

DECHETS

Jetez tout composant inutilisé dans la poubelle aux déchets biologiques. Lorsque vous videz le réactif FITC anti-Ig de souris dans l'évier, assurez-vous dans le diluer avec une large quantité d'eau, car l'azide de sodium qu'il contient peut être explosif en contact avec les égouts en cuivre ou en plomb. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

SENSIBILITE, SPECIFICITE ET AUTRES DONNEES DU TEST CHLAMYDIA CEL PN

Referez-vous au tableau récapitulatif en fin de notice. Toutes les données sur le test Chlamydia Cel Pn sont sur la fiche technique du produit. Contactez Cellabs ou votre distributeur pour l'obtenir.

NOTICE D'INDEMNITE

Toute modification ou variation du protocole d'emploi recommandé peut affecter les performances annoncées du produit. Un résultat positif ou négatif n'exclue pas la présence d'autres agents causatifs sous-jacents. Cellabs et ses agents et distributeurs ne sont légalement responsables d'aucun dommage dans de telles circonstances.

CHLAMYDIA CEL PN

VERWENDUNGSZWECK UND TESTPRINZIP

Der Chlamydia Cel Pn IF Test ist ein schneller, indirekter *in vitro* Immunfluoreszenztest zur Erkennung und Diagnose von *Chlamydia pneumoniae* in Patientenmaterial. Ein monoklonaler Antikörper gegen *C.pneumoniae* bindet spezifisch an chlamydiales Material in der Probe und ein zweiter Antikörper, FITC-konjugiertes anti-Maus IgG aus der Ziege, färbt die *C.pneumoniae*-Organismen.

INHALT DES KITS

	KC3 Demo	KC3 Standard	Bulk
RC3	Chlamydia Cel Pn Mab-Reagenz	0,25mL	1,25mL
RM	Anti-Maus Ig FITC-Reagenz	0,25ml	1,25ml
TW	Positiver Kontrollobjektträger (zum einmaligen Gebrauch)	1	1
RMF	Einbettungsmedium	2,5ml	2,5ml
	<i>Tests</i>	<i>10</i>	<i>50</i>
		<i>50</i>	<i>200</i>

Alle gelieferten Materialien sind gebrauchsfertig. Alle Komponenten sollten zwischen 2-8 °C gelagert werden. Das Verfalldatum ist auf jeder Kitkomponente und der Box deutlich gekennzeichnet. Die Verfalldaten ändern sich nicht nach dem Öffnen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Objektträger mit Testfeldrn von 6-8 mm Durchmesser, Mikropipetten mit Einmilspitzen zum Pipettieren von 25µl Azeton oder Methanol zur Fixierung der Proben; feuchte Kammer; Wasserbad; PBS zum Waschen; Deckgläser; nicht flammisierende Ölimmersion; Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (maximale Exzitationswellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 530nm) sowie 600- bis 1000-facher Vergrößerung.

VORERHURUNGEN

Nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet. Reagenzien sollten nicht nach dem Verfalldatum benutzt werden. Falls die Schutzverpackung beschädigt wurde, bitte den lokalen Vertreter kontaktieren und Ersatz anfordern. Reagenzien von verschiedenen Kits sollten nicht gemischt werden. Das Chlamydia Cel Pn Mab Bulk-Reagenz und das anti-Maus Ig FITC-Reagenz wurde für den Gebrauch mit den positiven Kontrollen von Cellabs, sowie dem mitgelieferten Einbettungsmedium optimiert. Evans Blau, das sich im IF-Reagenz befindet, ist ein mögliches Karzinogen, deshalb sollten Sie Kontakt mit der Haut meiden. Alle klinischen und Kontrollmaterialien sollten behandelt werden als wären sie potentiell infektiös und nach den jeweils laborüblichen Vorschriften entsorgt werden. Ein Positiver Kontrollobjektträger muss bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern zu den einzelnen Materialien.

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG DER OBJEKTRÄGER

RACHENABSTRICH: Proben sollten durch Abstriche mittels Wattetupfer im hinteren Nasopharynxbereich gewonnen werden.Der Abstrich wird dann auf dem Testfeld eines Objektträgers ausgerollt und danach in Azeton (bevorzugt) oder Methanol fixiert (5 Minuten) mit anschließender Trocknung an der Luft. Alternativ kann der Abstrich in 0,5 ml Chlamydien-Transportmedium gegeben werden (Herstellung siehe unten). Den Stäbchenschaft abbrechen und den Wattekopf im Transportmedium eingetaucht lassen. Den Wattekopf 10 Sekunden unter Schütteln extrahieren, danach 25µl des Extraktes auf das Testfeld eines Objektträgers geben und mit Methanol 5 Minuten fixieren. **Chlamydien-Transportmedium:** 68,46g Sucrose, 2,09g K₂HPO₄, 1,09g KH₂PO₄, Streptomycin 50µg/ml, Vancomycin 100µg/ml und Fungizone 5µg/ml. Sucrose in destilliertem Wasser auflösen, K₂HPO₄ und KH₂PO₄ zugeben, mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen und bei 115 °C 15 Minuten autoklavieren. Sterile Antibiotikaalösungen zugeben nach dem Abkühlen bei 2-8 °C lagern.

NASOPHARYNGEALE ASPIRATE (NPA) & BRONCHIOALVEOLÄRE LAVAGEN (BAL): 20 µl der ungewaschenen NPA-Probe auf das Testfeld eines Objektträgers geben. Trocknen und 5 Minuten mit Methanol oder Azeton fixieren. Falls NPA vor der Testfeldbeschichtung gewaschen wird bzw. BAL untersucht werden soll, die Proben 5 Minuten bei 12 000g in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren und den Überstand verworfen. Das Pellet in 100 - 500 µl PBS oder Transportmedium resuspendieren und 20 µl auf das Testfeld eines Objektträgers geben. Die Suspension trocknen und das Material 5 Minuten mit Methanol oder Azeton fixieren. Falls das Pellet in Transportmedium resuspendiert wurde, sollte Methanol verwendet werden. Zum Fixieren von Kulturmaterial, das in Plastikflaschen oder -schalen angezueht wurde, muß Methanol verwendet werden, da Azeton das Plastik angreift.

INDUZIERT E SPUTEN: Zu 2-3 ml Sputum gleiches Volumen 0,3% Dithiothreitol geben. 15-30 Sekunden vortexen. Anschliessend 5-10 Minuten bei 37 °C inkubieren (bei stark viskösem Material auf 30-60 Minuten verlängern). Gleiches Volumen PBS zu fügen und vortexen. Probe 10 Minuten mit 12000 xg oder 20-30 Minuten mit 2000-3000 xg bei Raumtemperatur zentrifugieren. Überstand verworfen und Sediment in 500 µl PBS resuspendieren. 25 µl auf das Testfeld eines Objektträgers geben und lufttrocknen lassen. 5 Minuten mit Azeton oder Methanol fixieren. Wenn die fixierte Probe nicht sofort getestet wird, bei 2-8 °C über Nacht oder bei -20 °C bis zu 2 Monaten lagern.

CHLAMYDIA CEL PN GEBRAUCHSANLEITUNG

- 25µl Chlamydia Cel Pn IF-Reagenz **RC3** auf die fixierte Probe sowie die Kontrolle **TW** geben. Das gesamte Testfeld soll bedeckt sein. Reagenz nach dem Gebrauch sofort wieder bei 2-8 °C lagern.
- 30 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubieren. Die Objektträger dürfen nicht austrocknen, weil dies unspezifische Bindungen bewirken kann.
- Vorsichtig in einem Bad mit PBS eine (1) Minute lang spülen.
- Flüssigkeit vom Objektträger ablaufen lassen und verbliebene Feuchtigkeit rund um das Testfeld mit einem Tuch abtupfen.
- 25µl **RM** auf die Testfelder mit Probe und Kontrolle geben.
- Schritte 2-4. wiederholen.
- Einen Tropfen **RMF** auf die Testfelder von Probe und Kontrolle geben. Ein Deckglas aufsetzen und Luftblasen entfernen
- Die gesamte Probe im Fluoreszenzmikroskop mittels Ölimmersion bei 600- bis 1000-facher Vergrößerung durchsehen. Sofort ablesen oder bei 2-8 °C (im Dunkeln) bis maximal 24 Stunden lagern.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE UND DIAGNOSESTELLUNG

Die häufigsten chlamydialen Formen, die in Proben gesehen werden, sind extrazelluläre Elementarkörperchen (EB's). Diese erscheinen als leuchtend apfelgrün fluoreszierende Punkte mit abgerundeten, diskusförmigen Formen (ungefähr 300nm im Durchmesser) und können gegen den Hintergrund des rotbraun gefärbten Materials erkannt werden. Retikularkörperchen (RB's) können ebenfalls erscheinen. Diese sind 2-3 mal so groß wie die EB's und sie fluoreszieren entweder gleichmäßig oder zeigen ein dunkles Zentrum mit einem fluoreszierendem Ring. Falls chlamydiale Einschlüsse anwesend sind, sehen sie denen der positiven Kontrolle ähnlich, d.h., eine Ansammlung von EB's und RB's innerhalb einer einschließenden Membran, die am Nukleus der Wirtszelle anliegt. Jedes Material das sich von chlamydialen Formen oder der apfelgrünen Fluoreszenz unterscheidet, sollte unberücksichtigt bleiben. Die Kontrollen sollten zum Vergleich des Aussehens und der Größe der EB's, die in der Proben gefunden werden, herangezogen werden. Eine positive Diagnose kann bestätigt werden, wenn fixierte Proben mindestens 4 chlamydiale Einschlusskörperchen aufweisen. Eine negative Diagnose kann dann bestätigt werden, wenn die fixierten Proben frei von solchen Einschlusskörperchen sind, aber intakte oder zerbrochene kolonnare Zellen aufweisen. Irreguläres fluoreszierendes Material, das sich in der Größe von den beschriebenen chlamydialen Körperchen unterscheidet oder weiss, rot oder gelb fluoresziert, sollte als unspezifisch angesehen werden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Alle nicht benötigten Komponenten müssen als biogefährdender Abfall entsorgt werden. Wenn das IF-Reagenz in das Waschbecken geschüttet wurde, muß mit großen Mengen Wasser nachgespült werden, da das darin enthaltene Natriumazid mit Kupfer-Bleiverbindungen des Rohrleitungssystems reagieren kann. Für mehr Informationen siehe die Sicherheitsdatenblätter.

SENSITIVITÄT, SPEZIFITÄT UND ANDERE DATEN ZUM CHLAMYDIA CEL PN

Siehe zusammenfassende Tabelle am Ende dieser Anleitung. Alle Daten zum Chlamydia Cel Pn können aus der Produktinformation entnommen werden. Fragen Sie bitte Ihren lokalen Vertreter oder kontaktieren Sie Cellabs.

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

Änderungen oder Modifikationen der empfohlenen Durchführung können die gemachten oder gefolgerten Angaben beeinflussen. Ein positives oder negatives Ergebnis schließt nicht andere zugrunde- liegende Krankheiten aus. Cellabs und seine Vertreter sind für Folgen derartiger Konstellation nicht haftbar.

CHLAMYDIA CEL PN

UTILIZAÇÃO E PRINCIPIO DO TESTE

O teste Chlamydia Cel Pn é um teste *in vitro* indireto por imunofluorescência para a detecção de organismos *Chlamydia pneumoniae* em amostras de doentes. Um anticorpo monoclonal anti-*C.pneumoniae* liga-se especificamente aos organismos presentes em amostras fixadas e, um segundo anticorpo, de cabra anti-rato Ig conjugado FITC, colora os organismos *C.pneumoniae*.

CONTEUDOS DO KIT

	KC3 Demo	KC3 Standard	Bulk
RC3	Reagente Chlamydia Cel Pn Mab	0,25mL	1,25mL
RM	Reagente Anti-rato Ig-FITC	0,25mL	1,25mL
TW	Lâmina de Controlo Positivo (para uma utilização)	1	1
RMF	Meio de Montagem	2,5mL	2,5mL
	<i>Testes</i>	<i>10</i>	<i>50</i>
		<i>50</i>	<i>200</i>

Os materiais fornecidos estão prontos a usar. Conservar a 2-8°C. As datas de validade estão referidas em cada componente do kit e na caixa do mesmo. As datas de validade não se alteram com a abertura dos componentes.

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO É FORNECIDO

Lâminas de microscópio com poços de 6-8mm de diâmetro; pipeta de precisão para dispensar 25µL; metanol ou acetona para fixar a amostra; câmara de humidade; Solução de lavagem; Tampão fosfato salino (PBS) para etapa de lavagem; lamelas; óleo de imersão não-fluorescente; microscópio de fluorescência com sistema de filtro para FITC (distância máxima de onda 490nm,emissão média 530nm) a 600X e 1000X de aumento.

PRECAUÇÕES

Apenas para diagnóstico *in vitro*. Não utilizar após ter passado a data de validade. Se a embalagem protectora for danificada, contactar o representante local e pedir a substituição por uma nova. Não misturar componentes de kits diferentes. O Reagente Chlamydia Cel Pn Mab e o reagente Ig-FITC foram otimizados para a utilização com a lâmina de controlo positivo e o meio de montagem fornecidos pela Cellabs. O Evans Blue, presente no reagente Ig-FITC, é um possível cancerígeno, e por isso deve ser evitado o contacto com a pele. As amostras de doentes e o slide controlo positivo devem ser manuseados como sendo potencialmente infecciosos. Em cada série de testes deve ser executada uma lâmina correspondente ao Controlo Positivo. Consultar a ficha de segurança do produto (MSDS) para mais informações.

COLHEITA DAS AMOSTRAS E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS DO

GARGANTA: Inserir a zaragatoa dentro da nasofaringe posterior colhendo assim a amostra. A amostra pode ser disposta numa lâmina e fixada em acetona (de preferência) ou metanol durante 5 minutos, deixando secar ao ar. A outra alternativa seria colocar a amostra em 0,5 mL de meio de transporte (ver instruções em baixo). Cortar a extremidade da zaragatoa e deixar esta submersa no meio. Agitar a zaragatoa durante 10 minutos e colocar 25µL numa lâmina e fixar com metanol durante 5 minutos.

Meio de Transporte Chlamydia: 68,46g sucrose, 2,09g K₂HPO₄, 1,09g KH₂PO₄, Estreptomicina 50 µg/mL, Vancomicina 100 µg/mL, e Fungizone 5 µg/mL. Dissolver sucrose, K₂HPO₄ e KH₂PO₄ em 1 litro de água destilada e autoclavar a 115°C durante 15 minutos. Adicionar as soluções antibióticas a frio. Conservar a 2-8°C.

ASPIRADO NASOFARINGEO (ANF) E DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA): Colocar 20µL do ANF não lavado no poço da lâmina, secar e fixar com metanol ou acetona durante 5 minutos. Centrifugar o Lavado Broncoalveolar (LBA) ou as amostras de ANF lavadas numa micro-centrifuga a 12000g durante 5 minutos e deitar fora o sobrenadante. Re-suspender a parte residual em 100-500 µL de PBS ou meio de transporte e colocar 20µL na lâmina. Secar e fixar as suspensões de PBS com metanol ou acetona durante 5 minutos e as suspensões de meio de transporte em metanol durante 5 minutos. Fixar, em frascos de plástico adequados, o que cresceu em culturas com metanol durante 5 minutos, visto que a acetona interfere com o plástico.

AMOSTRAS DE EXPECTORAÇÃO INDUZIDA: Agitar (vortex) 2-3 mL de expectoração com o mesmo volume de 0,3% de ditiotreitolo, de seguida, incubar durante 5-10 minutos a 37°C. Caso a amostra se apresente muito viscosa, incubar durante 30-60 minutos. Adicionar igual volume de PBS, agitar (vortex) e de seguida centrifugar a 12000g durante 10 minutos (ou 2000g durante 30 minutos). Descartar o sobrenadante e re-suspender em 500 µL de PBS. Pipetar 25µL numa lâmina e fixar com metanol ou acetona durante 5 minutos.

Caso as amostras fixadas não forem observadas imediatamente, conservar a 2-8°C, durante a noite, ou congelar a -20°C até 2 meses.

INSTRUÇÕES DE USO

- Adicionar 25µL de **RC3** à amostra fixada e a **TW**, cobrindo bem toda a área.
- Incubar as lâminas a 37°C numa câmara de humidade durante 30 minutos. Não deixar que as lâminas sequem; isto pode causar ligações não-específicas.
- Passar suavemente por uma lavagem de PBS por um minuto.
- Enxagar e remover eventual humidade à volta do poço com papel absorvente.
- Adicionar 25µL **RM** à amostra e a **TW**
- Repetir os passos 2-4.
- Adicionar uma gota de **RMF** ao poço da lâmina. Colocar a lamela sobre a gota retirando as bolhas de ar.
- Analisar toda a amostra com o auxílio de um microscópio de fluorescência, em óleo de imersão, inicialmente com aumento 600X e 1000X. Ler de imediato ou conservar a 2-8 °C no escuro num período máximo de 24 horas.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS E DO DIAGNÓSTICO

As formas de chlamydia mais comuns verificadas nas amostras são corpos extra-celulares elementares. Devem apresentar uma fluorescência com pontos verde clara, com uma estrutura em forma de disco (diâmetro aprox. de 300nm) de rebordo liso, podendo ser vistas sobre um fundo (vermelho-acastanhado) de células contra coloradas. Também se podem observar corpos reticulados (CR) que são 2-3 vezes maiores que os CE's e fluorescem em igual forma ou apresentam centros escuros com halos fluorescentes. Se existir a presença de inclusões estas serão parecidas com as presentes na lâmina de controlo positivo: uma massa de CE's e CR's dentro de uma membrana e aproximado ao núcleo da célula hospede. Todos os elementos fluorescentes de forma irregular que diferem em tamanho e/ou formato das células de Chlamydia descritos anteriormente não devem ser levados em consideração. A lâmina de controlo positivo deverá utilizar-se para comparar o aspecto e o tamanho dos CE's encontrados na amostra. Pode ser dado como positivo um resultado onde amostras fixadas e coloradas apresentem, pelo menos, 4 ou mais EB's *chlamydia*. Pode ser dado como negativo quando não existe presença de organismos *chlamydia* à excepção de células. Estas devem ser células epiteliais, intactas ou não. Todos os elementos fluorescentes de forma irregular que diferem em tamanho e/ou formato das células de Chlamydia descritos anteriormente ou que apresentem fluorescências de cor branca, vermelha ou amarela devem ser consideradas como coloração não-específica.

ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Deitar fora qualquer componente que tenha sido utilizado como material de risco biológico. Quando o reagente for despejado no lavatório verificar que isto é feito com quantidades abundantes de água. (este contém azida de sódio e pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo) Para mais informações consulte a MSDS.

SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, & OUTROS DADOS DO CHLAMYDIA CEL PN

Consultar sumário no final do folheto de instruções. Todos os dados sobre o Chlamydia Cel Pn podem ser consultados na folha de informação do produto. Contacte o distribuidor ou contacte a Cellabs.

NOTA SOBRE POSSÍVEIS INDEMINIZAÇÕES

As modificações realizadas aparte do protocolo recomendado podem afectar os resultados. Um resultado positivo ou negativo não exclui a presença de outros agentes causadores subjacentes. A Cellabs e os seus distribuidores não serão legalmente responsáveis por qualquer dano nestas circunstâncias.

CHLAMYDIA CEL PN

IMPIEGO E PRINCIPIO DEL TEST

Il test Chlamydia Cel Pn IF è un test *in vitro* in immunofluorescenza indiretta per la determinazione di *Chlamydia pneumoniae* in campioni di provenienza clinica. Un anticorpo monoclonale verso *C. pneumoniae* lega specificatamente il microorganismo presente nei campioni fissati ed un secondo anticorpo, immunoglobuline di montone anti-topo coniugate con FITC, colora le cellule di *C. pneumoniae*, che appaiono come corpi elementari (Elementary Body – EB) verde brillante e corpi reticolati (Reticulate Body – RB) o inclusioni.

CONTENUTO DEL KIT

RC3	Reagente Chlamydia Cel Pn Mab	KC3 Demo	KC3 Standard	Bulk
		0.25mL	1.25mL	5mL
RM	Reagente FITC anti-topo	0.25mL	1.25mL	5mL
TW	Vetrino di Controllo Positivo (solo ad uso singolo)	1	1	-
RMF	Mezzo di montaggio.	2.5mL	2.5mL	-
	<i>Tests</i>	<i>10</i>	<i>50</i>	<i>200</i>

I materiali sono forniti pronti all'uso. Conservare a 2-8°C. Le date di scadenza sono chiaramente marcate su ogni componente del kit e sulla confezione. Le date di scadenza non cambiano una volta aperte le confezioni.

MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

Vetrini per microscopio con pozzetti di diametro 6-8 mm; pipetta di precisione per distribuire 25µL; acetone o metanolo per fissare il campione; camera umida; vaschetta di lavaggio; tampone fosfato salino (PBS) per il lavaggio; vetrini coprioggetto; olio per immersione non fluorescente; microscopio a fluorescenza con sistema di filtraggio FITC (lunghezza d'onda di eccitazione massima 490nm, lunghezza d'onda media 530nm) e ingrandimento 600x-1000x.

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico *in vitro*, non usare dopo la data di scadenza mostrata sull'etichetta. Se l'imballo protettivo è danneggiato, contattare il distributore di zona e chiedere una sostituzione. Non mischiare i componenti provenienti da kit diversi. Chlamydia Cel Pn Mab e il Reagente FITC anti-topo sono stati ottimizzati per l'impiego insieme al Vetrino di Controllo Positivo Cellabs e al Mezzo di Montaggio Cellabs. Il colorante Evans Blue contenuto nel reagente anti-topo Ig-FITC può essere cancerogeno, quindi evitare il contatto con la pelle. I campioni clinici e i vetrini di controllo positivo devono essere maneggiati come potenzialmente infetti. Si deve eseguire un Vetrino di Controllo Positivo con ogni test eseguito.Per maggiori informazioni consultare la scheda di sicurezza del prodotto (MSDS).

RACCOLTA DEI CAMPIONI

TAMPONE FARINGEO: Inserire il tampone lungo il nasofaringe posteriore e prelevare il campione. Il tampone deve essere strisciato sul vetrino che poi deve essere fissato in acetone o metanolo (preferibilmente acetone) per 5 minuti e quindi lasciarlo asciugare all'aria. In alternativa porre il tampone in 0.5mL di terreno di trasporto Chlamydia (vedere le istruzioni sotto riportate). Tagliare l'asta del tampone e lasciarlo immerso nel terreno. Roteare il tampone per 10 secondi e dispensare 25 µl sul vetrino e fissare nel metanolo per 5 minuti.

Terreno di trasporto Chlamydia: 68.46g saccarosio, 2.09g K₂HPO₄, 1.09g KH₂PO₄, Streptomicina 50 µg/mL, Vancomicina 100 µg/mL, e Funzione 5 µg/mL. Dissolvere saccarosio, K₂HPO₄ e KH₂PO₄ portando ad 1 litro di acqua distillata e autoclavare a 115°C per 15 minuti. Aggiungere la soluzione antibiotica STERILE quando è raffreddata. Conservare a 2-8°C.

ASPIRATO NASOFARINGEO (NPA) & LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE (BAL): Dispensare 20 µL di aspirato nasofaringeo (NPA) in un singolo pozzetto del vetrino. Far asciugare e fissare nel metanolo o acetone per 5 minuti. Centrifugare il campione LBA o il campione di aspirato naso faringeo precedentemente lavato, in una microcentrifuga a 12.000 g per 5 minuti e scartare il supernatante. Risospendere il pellet in 100 – 500 µL di PBS o terreno di trasporto e dispensare 20 µL sul vetrino. Far asciugare e fissare la sospensione di PBS in metanolo o acetone per 5 minuti e la sospensione in terreno di trasporto solo in metanolo per 5 minuti. Per il fissaggio delle culture cresciute in capsule o bottiglie di plastica, deve essere usato il metanolo per 5 minuti perché l'acetone danneggia la plastica.

CAMPIONI DI ESCREATO INDOTTO: passare al Vortex 2-3ml di escreato con un eguale volume di ditiotretolo allo 0,3%, quindi incubare per 5-10 minuti a 37°C. Se il campione è molto viscoso, incubarlo per 30-60 minuti. Aggiungere un pari volume di PBS, passare al Vortex e quindi centrifugare a 12.000g per 10 minuti (o 2.000g per 30 minuti). Eliminare il sovrantante e risospendere il pellet in 500µL di PBS. Distribuirne 25µL su un vetrino e fissare in metanolo o acetone per 5 minuti.

Se il campione fissato non viene saggiato immediatamente, conservarlo a 2-8°C per una notte o a -20°C per massimo 2 mesi.

ISTRUZIONI PER L'USO

- Aggiungere 25µL di **RC3** allo striscio del campione fissato e al **TW**, coprendo l'intera area del pozzetto.
- Incubare i vetrini a 37°C in camera umida per 30 minuti. Non lasciare che i vetrini si asciughino onde evitare legami aspecifici.
- Lavare delicatamente in una vaschetta con PBS per un minuto.
- Drenare il vetrino e rimuovere l'eccesso di umidità intorno ai pozzetti con del tessuto.
- Aggiungere 25µL di **RM** al campione e **TW**
- Ripetere il punto 2 e 4.
- Aggiungere una goccia **RMF** sul pozzetto del vetrino. Deporre un vetrino copri oggetto sulla goccia ed eliminare le bolle d'aria.
- Esaminare l'intero campione usando un microscopio a fluorescenza in immersione ad olio a 600x-1000x d'ingrandimento. Leggere immediatamente o conservare a 2-8°C al buio fino a 24 ore.

LETTURA, INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E DIAGNOSI

Le forme clamidiali più comuni sono corpi elementari (EB) extracellulari. Appaiono brillanti, puntiformi di colore verde-mela, a forma di disco dal bordo liscio (approssimativamente di 300 nm di diametro) e possono essere viste contro uno sfondo rosso-bruno di cellule colorate con colorante di contrasto. Si possono osservare anche i corpi reticolati. Si presentano 2 o 3 volte più grandi dei corpi elementari, fluorescenti oppure scuri al centro con un alone di fluorescenza. Se si presentano inclusioni appariranno simili a quelle nel vetrino di controllo positivo, ovvero una massa di EB e RB entro una membrana che li racchiude, adiacente al nucleo della cellula ospite. Qualsiasi struttura che può essere distinta da forme clamidiali o con fluorescenza diversa da quelle verde mela deve essere ignorata. Il vetrino di controllo deve essere usato per il confronto con l'apparenza e la misura delle EB trovate nel campione. La diagnosi positiva può essere fatta quando il campione fissato e colorato mostra almeno quattro o più EB clamidiali. La diagnosi è negativa quando strisci fissati non presentano organismi clamidiali ma cellule. Queste cellule devono essere cellule epiteliali a colonna intatte o rotte. Altre forme irregolari di fluorescenza con forme diverse dai corpi clamidiali descritti o con fluorescenze bianche, rosse o gialle non devono essere prese in considerazione.

RACCOMANDAZIONI PER LO SMALTIMENTO

Eliminare qualsiasi componente non utilizzato come rifiuto potenzialmente infettivo. Quando il reagente anti-topo Ig-FITC viene eliminato nel lavello, assicurarsi che sia dilavato con grande quantità d'acqua (poiché la sodio azide contenuta può reagire con le tubature di rame o piombo). Per maggiori informazioni consultare la scheda di sicurezza (MSDS).

SENSIBILITA', SPECIFICITA' ED ALTRI DATI SULLA CHLAMYDIA CEL PN

Vedere la tabella riassuntiva alla fine del foglio di istruzioni. Tutti i dati sulla Chlamydia Cel Pn sono disponibili sul foglio di istruzioni che è possibile richiedere al distributore di zona o contattando Cellabs.

AVVERTENZE SULL'INDENNIZZO

Modifiche o cambiamenti apportati alla procedura raccomandata possono modificare lo stato o causare reclami. Un risultato positivo o negativo non preclude la presenza di altri agenti eziologici. Cellabs ed i suoi distributori non saranno responsabili per i danni causati da questa eventualità.

CHLAMYDIA CEL PN

APLICACIONES Y PRINCIPIO DEL TEST

El Test Chlamydia Cel Pn If es un ensayo in vitro por inmunofluorescencia indirecta para la detección directa de organismos de *Chlamydia pneumoniae* en muestras clínicas. Un anticuerpo monoclonal frente a *C. pneumoniae* se une específicamente a los organismos presentes en las muestras fijadas, y un segundo anticuerpo, de cabra anti Ig de ratón conjugado con FITC, tinte los organismos de *C. pneumoniae*.

CONTENIDO DEL KIT

RC3	Reactivo de Chlamydia Cel Pn Mab	KC3 Demo	KC3 Standard	Bulk
		0.25mL	1.25mL	5mL
RM	Reactivo de Anti- Ig de ratón-FITC	0.25mL	1.25mL	5mL
TW	Porta control positivo (un único uso)	1	1	-
RMF	Medio de montaje	2.5mL	2.5mL	-
	<i>Tests</i>	<i>10</i>	<i>50</i>	<i>200</i>

Los materiales suministrados están listos para su uso. Almacenar a 2-8°C. Las fechas de caducidad están indicadas específicamente en cada uno de los componentes del kit y en el envase externo del mismo. Las fechas de caducidad no cambian tras la apertura de los viales.

MATERIALES REQUERIDOS QUE NO SE PROPORCIONAN

Portas para microscopia con pocillos de 6-8mm de diámetro, pipeta de precisión para añadir 25µL; acetona o metanol para la fijación de la muestra; cámara húmeda, cubeta para lavado; tapón fosfato (PBS) para el paso de lavado; cubres; aceite de inmersión no fluorescente; y microscopio de fluorescencia con sistema de filtro para FITC (longitud de onda de excitación máxima 490nm, longitud de onda de emisión media 530nm) y x600-x1000 aumentos.

PRECAUCIONES

Para utilización exclusiva en el diagnóstico in vitro. No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Si se observase que el envase externo está dañado, contactar con su distribuidor local y solicitar un kit nuevo. No mezclar componentes de diferentes kits. El reactivo Chlamydia Cel Pn Mab y el reactivo Anti- Ig de ratón-FITC han sido optimizados para su uso con el porta control positivo y el medio de montaje Cellabs. El colorante de contraste azul de Evans incluido en el reactivo Anti Ig de ratón-FITC es un posible carcinógeno, por lo que debe evitarse el contacto con la piel. Las muestras de los pacientes y el porta control positivo deberían manipularse como si se tratase de material potencialmente infeccioso. Debe incluirse un porta de control positivo en cada ensayo. Para más información al respecto, consultar la ficha de seguridad (FDS).

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y PREPARACION DE LOS PORTAS

TORUNDAS DE GARGANTA: Insertar la torunda en la nasofaringe posterior y recoger la muestra. La torunda con la muestra debe extenderse sobre un porta y fijarse con acetona o metanol (preferiblemente acetona) durante 5 minutos, y dejarse secar al aire. Otra opción es colocar la torunda en 0.5mL de medio de transporte de Chlamydia (vér composición más adelante). Cortar el bastón de la torunda y dejar la torunda sumergida. Agitar la torunda en un agitador vortex durante 10 segundos, colocar 25µL sobre el porta y fijar en metanol durante 5 minutos.

Medio de Transporte de Chlamydia: 68.46g sacarosa, 2.09g K₂HPO₄, 1.09g KH₂PO₄, estreptomicina 50 µg/mL, Vancomicina 100 µg/mL, y Funzione 5 µg/mL. Dissolver la sacarosa, el K₂HPO₄ y KH₂PO₄ en agua destilada hasta 1 litro y autoclavar a 115°C durante 15 minutos. Añadir las soluciones antibióticas ESTÉRILES cuando se haya enfriado. Almacenar a 2-8°C o temperatura inferior.

ASPIRADO NASOFARINGEO (ANF) Y LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA): Colocar 20 µL de la muestra de ANP sin lavar sobre un único pocillo del porta, secar y fijar en metanol o acetona durante 5 minutos. Centrifugar las muestras de ANP lavadas o de LBA en una microfuga a 12000g durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 100 – 500 µL de PBS o medio de transporte y colocar 20 µL en un porta. Secar y fijar las suspensiones de PBS en metanol o acetona durante 5 minutos, y las suspensiones de medio de cultivo en metanol durante 5 minutos. Fijar los cultivos en placas de plástico o en botellas, en metanol durante 5 minutos ya que la acetona podría afectar al plástico.

MUESTRAS DE ESPUTO INDUCIDAS: Mezclar un volumen de 2-3ml de la muestra de esputo con la misma cantidad de ditiotretol al 0.3%, agitar con ayuda de un vortex e incubar durante 5-10 minutos a 37°C. Incubar durante 30-60 minutos si la muestra fuera viscosa. Añadir el mismo volumen de PBS, agitar con vortex, y centrifugar a 12000g durante 10 minutos (o a 2000g durante 30 minutos). Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 500 ml de PBS. Depositar 25 ml sobre un porta y fijar en metanol o acetona durante 5 minutos.

Si las muestras fijadas no van testarse inmediatamente, almacenar a 2-8°C durante toda la noche o congelar a -20°C hasta 2 meses.

INSTRUCCIONES DE USO

- Añadir 25µL del **RC3** a la muestra fijada y **TW**, cubriendo completamente el área del pocillo.
- Incubar los portas a 37°C en una cámara húmeda durante 30 minutos. No permitir que los portas se sequen, ya que esto podría dar lugar a uniones inespecíficas
- Lavar con cuidado en un baño de PBS durante un minuto.
- Escurrir el líquido del porta y eliminar el exceso de humedad alrededor del pocillo con papel secante.
- Añadir 25µL del **RM** a la muestra y **TW**.
- Repetir pasos 2 - 4.
- Añadir una gota de **RMF** al pocillo del porta. Colocar un cubre sobre la gota y eliminar las burbujas.
- Leer la muestra completa utilizando un microscopio de fluorescencia bajo aceite de inmersión a x600-x1000 aumentos. Leer inmediatamente o almacenar a 2-8°C en oscuridad hasta un máximo de 24 horas.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y DIAGNOSTICO

Las formas de Chlamydia más comunes observadas en las muestras son los cuerpos elementales extracelulares (EB). Se muestran como cuerpos en forma de disco de borde liso, muy pequeños, brillantes y con una fluorescencia de color verde manzana (de aproximadamente 300nm de diámetro) y se pueden ver sobre un fondo de células contrastadas marrón rojizas. También pueden observarse cuerpos reticulares (RB). Éstos son de 2 a 3 veces más grandes que los EB y presentan una fluorescencia uniforme, o bien un centro oscuro con un halo fluorescente. Si hay presencia de inclusiones, su aspecto será similar a las del porta control positivo, es decir, una masa de EB y RB dentro de una membrana envolvente adyacente al núcleo de la célula huésped. No debe tenerse en cuenta ningún elemento que difiera de las formas de Chlamydia o que presente una fluorescencia distinta del verde manzana. El porta control debe utilizarse para comparar el aspecto y el tamaño de los EB encontrados en la muestra. Puede realizarse un diagnóstico positivo cuando las muestras teñidas y fijadas muestren un número al menos cuatro veces superior de EB de Chlamydia. Un diagnóstico puede informarse como negativo cuando las extensiones teñidas y fijadas se encuentran libres de Chlamydias pero están presentes las células. Estas células pueden ser células columnares intactas o rotas. Otro material fluorescente con forma irregular que difiera en el tamaño de los cuerpos de Chlamydia descritos anteriormente, o que muestre una fluorescencia blanca, amarilla o roja deberá ser considerado como tinción inespecífica.

ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS

Los componentes sin usar deben eliminarse como material de riesgo biológico. Si el reactivo anti-Ig de ratón-FITC se elimina por el sistema de desagüe, asegurarse de enjuagarlo con abundante agua corriente (la azida sódica que contiene puede reaccionar con las conducciones de cobre o plomo). Para más información, consultar la ficha de datos de seguridad FDS.

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, Y OTROS DATOS RELATIVOS AL ENSAYO CHLAMYDIA CEL PN

Consultar la tabla con el esquema del protocolo al final de este manual. Todos los datos sobre el ensayo de Chlamydia Cel Pn se pueden obtener en la ficha técnica del producto. Para más información, preguntar a su distribuidor local o contactar con Cellabs.

INFORMACIÓN SOBRE POSIBLES INDEMNIZACIONES

Las modificaciones o cambios realizados sobre el procedimiento recomendado pueden afectar a las posibles reclamaciones tanto directa como indirectamente. Un resultado positivo o negativo no excluye la presencia de otros agentes etiológicos subyacentes. Ni Cellabs ni sus agentes o distribuidores serán legalmente responsables por daños producidos bajo estas circunstancias.