



SeroELISA™ Chlamydia TRUE IgM

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) per la determinazione di anticorpi IgM specifici per **Chlamydia** nel siero umano

Istruzioni per l'Uso

Kit per 96 determinazioni
(Catalogo No. 112-01)

Per Uso Diagnostico In Vitro
Solo per uso professionale
Conservare a 2-8°C. **Non Congelare**

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL

Tel: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Applicazioni

Il kit SeroELISA™ Chlamydia TRUE IgM è progettato per la determinazione di anticorpi IgM specifici per Chlamydia in un singolo campione di siero con un Test Immunoenzimatico (ELISA).

Per Uso Diagnostico In Vitro.

Introduzione

Chlamydia è un batterio gram-negativo obbligato intracellulare che causa malattie acute e croniche in specie di mammiferi e uccelli. Il genere Chlamydia comprende quattro specie: *C.trachomatis*, *C.pneumoniae*, *C.psittaci* e *C. pecorum*.

C.trachomatis si divide in 15 serovar (1). I serovar A, B, Ba e C sono agenti dei tracoma (2), la causa principale di cecità endemica prevenibile nel terzo mondo. I serovar L₁-L₃ sono gli agenti del linfogranuloma venereo. I serovar D-K sono causa comune in tutto il mondo di infezioni genitali sessualmente trasmesse: cervicite, endometrite/ salpingite (3) nelle femmine e uretrite (4) in maschi e femmine. L' endometrite/salpingite può portare a occlusione tubarica con aumentato rischio di gravidanza extrauterina e infertilità. L'infezione genitale può causare occasionalmente un'infezione acuta e persistente senza sintomi clinici. Generalmente, queste infezioni sono trattabili una volta diagnosticate. Comunque, senza trattamento l'infezione può progredire a infiammazione cronica grave e portare a infertilità, gravidanza ectopica, aborto indotto o parto prematuro. Inoltre, I neonati di madri infette possono infettarsi durante il parto e contrarre congiuntiviti o polmonite (5). *C.pneumoniae* è un importante patogeno respiratorio nell'uomo e causa fino al 10% dei casi di polmonite

acquisita in comunità. E' stato associato con malattie respiratorie acute, polmonite, asma, bronchite, faringite, sindrome toracica acuta, malattia coronaria e sindrome di Guillain-Barre (6).

C.psittaci infetta una diversa gamma di specie ospiti dai molluschi agli uccelli ai mammiferi e causa anche gravi polmoniti.

I test serodiagnostics, che si basano su specifici marker immunologici, servono da strumenti diagnostici non invasivi nell'identificazione delle infezioni sia distali sia profonde (7).

E' stato provato che gli anticorpi IgM ANTI-Chlamydia hanno valore diagnostico nella polmonite causata da *C. pneumoniae* (TWAR) e *C.psittaci* (8). Il pattern serologico di Chlamydia IgM nella polmonite da clamidia è come segue: anticorpi sono prodotti nelle fasi iniziali della malattia, si osserva un picco dopo 1-2 settimane e generalmente si osserva un calo graduale fino a livelli non rilevabili entro 2-3 mesi (11). Questo pattern è stato osservato nel 20-50% dei bambini nati da madri coltura-positiva per *Chlamydia trachomatis* e/o con dimostrati livelli elevati di anticorpi IgG e IgA specifici contro Chlamydia.. Questi bambini hanno sviluppato una polmonite da clamidia durante i primi 6 mesi di vita (7).

Poichè le IgM sono presenti solo nella malattia acuta e/o recente (9), il test Chlamydia IgM richiede solo un singolo campione e i risultati possono essere limitati a segnalare la presenza o assenza di IgM immuni. Alti titoli di IgG immuni, che competono con le IgM immuni per gli stessi determinanti antigenici, possono produrre falsi risultati IgM negativi. Il Fattore Reumatoide (Rf, attività autoimmune) causa risultati IgM falsi positivi (10). Quindi, lo stripping di IgG ed Rf dal siero è parte essenziale del test per le IgM.

SeroELISA™ Chlamydia impiega l'antigene ad ampia reattività del serovar L₂ di *C. trachomatis che* rievla anticorpi per *C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae* (TWAR).

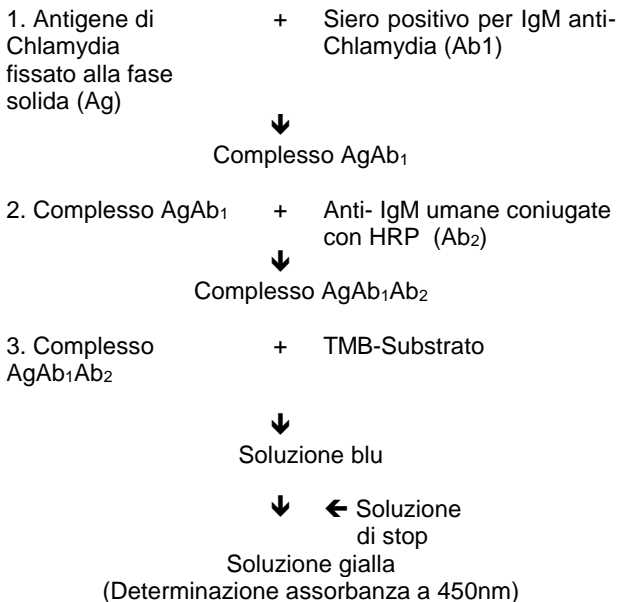
Principio del Test

- Il siero umano da saggiare è messo in contatto con il materiale antigenico che riveste i micropozzetti. Gli anticorpi specifici, se presenti nel siero del paziente si legheranno agli antigeni immobilizzati formando un complesso antigene-anticorpo. Se il siero in esame non contiene anticorpi per questo particolare antigene, non si forma alcun complesso e tutte le componenti seriche vengono lavate via nella fase di lavaggio.
- Anti-IgM umane (catena μ specifiche) coniugate con perossidasi di rafano (HRP) vengono aggiunte nel pozzetto. Se un complesso antigene-anticorpo si è formato nel passaggio precedente, l'anticorpo coniugato con perossidasi si legherà al complesso antigene-anticorpo. Se nel passaggio precedente non si era formato alcun complesso, il coniugato viene lavato via nella fase di lavaggio.
- Si aggiunge il cromogeno-substrato (TMB-H₂O₂). Una reazione positiva è indicata da un colore da blu a blu intenso che si sviluppa nei pozzetti a seguito della reazione enzimatica della perossidasi con il perossido e il cromogeno. La reazione enzimatica

viene poi fermata con una soluzione acida e si determina l'assorbanza dei pozzetti a 450nm con uno spettrofotometro.

- L'assorbanza a 450nm è indicativa del titolo di IgM anti-Chlamydia nei campioni di siero dei pazienti.

Procedimento del test



Avvertenze e Precauzioni

- **Avvertenza:** IL MATERIALE ANTIGENICO CLAMIDIALE E' STATO INATTIVATO E NON CONTIENE ORGANISMI VIVENTI RILEVABILI. COMUNQUE, LE STRISCE DOVREBBERO ESSERE MANIPOLATE ED ELIMINATE COME OGNI MATERIALE DI LABORATORIO A RISCHIO BIOLOGICO.
- **Precauzioni:** Questo kit contiene siero umano che è stato testato con metodiche approvate dall'FDA, ed è risultato negativo per HBsAg, e per anticorpi anti-HCV e anti-HIV 1 & 2. Poiché nessun metodo conosciuto può dare assicurazione totale che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano infezioni, tutte le componenti derivate da sangue umano fornite in questo kit devono essere maneggiate come siero o sangue potenzialmente infettante, secondo le raccomandazioni pubblicate nel manuale del CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988.
- **Per Uso Diagnostico *In-vitro*.**

Contenuto del kit

1. Micropiastra pre-rivestita (96 pozzetti). Ogni busta contiene una piastra costituita da 12 strisce rimuovibili su una cornice di plastica. Ogni striscia è rivestita con antigeni di Chlamydia. **1 Unità**
2. Controllo Positivo (siero umano positivo per anticorpi IgM anti-Chlamydia). Pronto per l'uso. **1 flacone, 2.0 ml**

3. Controllo Negativo (siero umano negativo per anticorpi IgM anti-Chlamydia). Pronto per l'uso. **1 flacone, 2.0 ml**
4. Anticorpi anti-IgM umane (catena-μ specifiche) coniugati con HRP. Pronto per l'uso. **1 flacone, 10 ml**
5. Diluente del siero IgM, Pronto per l'uso. **2 flacone, 60 ml**
6. Tampone di lavaggio concentrato (x20). **1 flacone, 100 ml**
7. TMB-Substrato, Pronto per l'uso. **1 flacone, 16 ml**
8. Soluzione d'arresto (H₂SO₄ 1M), Pronto per l'uso. **1 flacone, 16 ml**
9. Copripiastra. **1 Unità**
10. Istruzioni per l'uso. **1**

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

1. Provette pulite per la diluizione dei sieri dei pazienti
2. Micropipette regolabili, o multicanale (5-50, 50-200 e 200-1000μl) e puntali monouso.
3. Pipette di plastica monouso (varie misure) e attrezzatura per pipettaggio in sicurezza.
4. Beuta volumetrica da 1 litro.
5. Un cilindro volumetrico da 50ml.
6. Lavatore per piastre ELISA o bottiglia per lavaggi.
7. Asciugamani di carta o carta assorbente.
8. Vortex mixer.
9. Bagnomaria a 37°C con coperchio, o camera umida in incubatore a 37° ± 1°C.
10. Lettore-ELISA con filtro a 450nm.
11. Acqua distillata o bi-deionizzata per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.

Conservazione e Stabilità dei Reagenti

Tutti i materiali forniti devono essere conservati a 2° - 8°C. Se conservati a 2° - 8°C I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla scatola. L'esposizione di flaconi ancora sigillati a temperatura ambiente per alcune ore non causa danno ai reagenti stessi. **NON CONGELARE!**

Quando un kit è in uso, la scadenza del materiale è di 60 giorni dalla prima apertura del flacone. Una volta aperto, il sacchetto di alluminio contenente le strisce dovrebbe essere sigillato con nastro adesivo. Il materiale disidratante non deve essere rimosso.

Cristalli possono formarsi nel Tampone di Lavaggio concentrato (20X) durante la conservazione refrigerata,ciò è perfettamente normale. Ridisciogliere i cristalli riscaldando il tampone a 37°C prima di diluire. La soluzione diluita può essere conservata a 2-8°C fino a 21 giorni.

Raccolta dei Campioni

I campioni di siero dovrebbero essere raccolti asetticamente e conservati a 2° - 8°C con 0.05% sodium azide (NaN₃) come conservante se devono essere testati entro pochi giorni. Per periodi più lunghi, aliquote dei campioni di siero dovrebbero essere conservate a - 20°C.

Poiché campioni di siero torbido o emolitico possono dare risultati meno riproducibili, si raccomanda

vivamente che i campioni di siero da saggiare siano limpidi e non emolitici.

Procedura del Test

Note:

- a) Le componenti di questo kit sono state testate come singola unità. Non mescolare componenti da lotti diversi o da kit di altro produttore.
- b) Tutti i reagenti devono essere a temperatura ambiente prima dell'uso. Diluente del Siero e Diluente del Coniugato gelificano quando refrigerati. Se necessario, accelerare la liquefazione riscaldando queste componenti a 37°C per alcuni minuti.
Cristalli di sale possono formarsi nel tampone di Lavaggio Concentrato conservato a 2°- 8°C. Questi cristalli dovrebbero essere completamente ridisciolti riscaldando a 37°C prima della diluizione.
- c) Non eseguire il test in presenza di vapori reattivi (p.es. da acidi, alcali o aldeidi) o polveri, in quanto possono influenzare l'attività enzimatica del coniugato Anti-IgM Umane-HRP
- d) Non toccare la cima delle strisce. Non toccare i bordi dei pozzetti con la punta delle pipette dispensando i reagenti.
- e) Usare puntali monouso. Evitare contaminazione crociata tra reagenti.
- f) Battere leggermente il flacone su una superficie rigida per liberare il liquido che potrebbe essere intrappolato sul tappo.
- g) Evitare la formazione di bolle d'aria nei pozzetti.
- h) Dispensare i liquidi lentamente per evitare vaporizzazione.
- i) Controllo Positivo e Controllo Negativo dovrebbero essere testati assieme ai campioni di siero ogni volta che si esegue il test
- j) Un pozzetto dovrebbe essere usato per il bianco ogni volta che si esegue il test.
- k) Tutti i passaggi dovrebbero essere eseguiti sequenzialmente senza interruzione.

Procedimento del Test - Manuale

A) Prelavaggio delle strisce

È consigliabile eseguire un prelavaggio delle strisce prima di dare inizio all'esame per ridurre il segnale dei rumori di fondo.

1. Rimuovere il numero necessario di strisce dalla bustina in carta di alluminio e inserirli nel telaio della piastra.
2. Diluire la soluzione di lavaggio concentrata 1:20 con acqua distillata. Per 100ml di soluzione di lavaggio, utilizzare 5ml di soluzione di lavaggio concentrata con 95ml di acqua distillata e mescolare bene.
La soluzione di lavoro a base di soluzione di lavaggio deve essere preparata prima dell'uso e la quantità in eccesso deve essere smaltita.
3. Lavare le strisce con la soluzione di lavaggio, dopodiché smaltire il contenuto delle strisce. Ripetere questo passaggio ancora **una** volta.
4. Asciugare la parte superiore delle strisce e il telaio tamponando delicatamente con carta assorbente pulita.

B) Incubazione dei Campioni di Siero e dei Controlli

5. Diluire ogni campione 1/105 con il Diluente del Siero fornito aggiungendo 10µl di siero del

paziente a 200µl di Diluente del Siero (1/21), e quindi diluire ulteriormente aggiungendo 25µl della diluizione 1/21 a 100µl di Diluente del Siero.

Nota: Il Diluente del Siero contiene Anti-IgG umane per la rimozione di anticorpi IgG dal siero umano.

I **Controlli** sono forniti pronti per l'uso e non devono essere diluiti.

6. Pipettare 50µl del Controllo Positivo e Negativo (Pronti all'uso) e dei campioni di siero (diluiti 1/105) in corrispondenti pozzetti separati. Pipettare 50µl di Diluente del Siero IgM in un pozzetto per il Bianco.
Il pipettaggio dei controlli e dei campioni di siero nei pozzetti non dovrebbe protrarsi oltre 10 minuti.
7. Coprire le strisce con un copripietra e incubare per 30 minuti a 37°C in camera umida.
8. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti. Lavare i pozzetti **cinque** volte e asciugare come ai punti A).

C) Incubazione con Coniugato

9. Pipettare 50µl of HRP Coniugato Anti-IgM Umane-HRP diluito in ogni pozzetto.
10. Coprire le strisce con un copripietra e incubare per 30 minuti a 37°C in camera umida.
11. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti, lavarli **cinque** volte e asciugarli come ai punti A).

D) Incubazione con TMB-Substrato

12. Pipettare 100µl di TMB-Substrato in ogni pozzetto.
13. Coprire le strisce con un copripietra e incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.
14. Arrestare la reazione aggiungendo 100µl di Soluzione d'Arresto in ogni.
Pipettare la Soluzione d'Arresto nella stessa sequenza e agli stessi intervalli di tempo del TMB-Substrato al punto D14.
15. Calibrare lo spettrofotometro sul pozzetto del bianco. Determinare l'assorbanza a 450nm e registrare i risultati.
E' consigliabile l'immediata lettura dell'assorbanza (anche se non indispensabile). La determinazione dell'assorbanza non dovrebbe superare i 30 minuti, dopo l'arresto della reazione cromogena.

Accettabilità del Test

Un test è valido se:

- Assorbanza del Controllo Positivo ≥ 0.8 a 450nm
 - Assorbanza del Controllo Negativo ≤ 0.15 a 450nm
- Se queste condizioni non sono soddisfatte, il test non è valido e dovrebbe essere ripetuto.

Calcolo del Valore di Cut-Off (COV)

Il cut-off è calcolato secondo la seguente formula:

$$COV = 0.24 \times (Pc - Nc) + Nc$$

Pc = Assorbanza del Controllo Positivo a 450nm

Nc = Assorbanza del Controllo Negativo a 450nm

Interpretazione dei Risultati

Absorbanza a 450nm	Risultati	Interpretazione dei Risultati
Sotto COV-0.03	Negativo	Anticorpi IgM anti Chlamydia non rilevabili
COV±0.03	Equivoco	Rianalizzare i campioni classificati equivoci. Se il risultato equivoco si ripete si raccomanda di testare un ulteriore campione prelevato successivamente
Sopra COV +0.03	Positivo	Indicazione di infezione clamidiale acuta e/o recente

Limitazioni del Test

- Nessun singolo test serologico dovrebbe essere usato come unico criterio per la diagnosi. Tutti i dati clinici e di laboratorio dovrebbero essere considerati.
- Il test è un ELISA su singolo serovar (L₂). L₂ contiene determinanti antigenici esistenti in serovar di *Chlamydia trachomatis* come pure antigeni di gruppo. Anticorpi contro *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) e *Acinetobacter calcoaceticus* possono anche essere rilevati con questo ELISA.
- Questo test non indica il sito di infezione da chlamydia e non intende sostituire l'isolamento in coltura cellulare, se disponibile.
- Poiché l'infezione da Chlamydia può non produrre sintomi significativi immediati, la fase acuta può non essere individuata e possono non esservi anticorpi IgM rilevabili. L'assenza di anticorpi misurabili nel siero non esclude la possibilità di infezione da clamidia.
- Il siero contaminato da batteri o iperlipemico può dare risultati erranei.

Prestazioni Caratteristiche

SeroELISA™ Chlamydia è stato confrontato con IPAzyme™ Chlamydia TRUE IgM test (Savyon Diagnostics product, Cat. No. 012-01) che è un test serologico accettato per la determinazione di anticorpi IgM contro Chlamydia.

La popolazione studiata includeva pazienti con sospetta infezione da Chlamydia come pure individui sani (n=162). I risultati sono riassunti come segue:

Confronto tra SeroELISA™ ed IPAzyme™

SeroELISA™ \ IPAzyme™	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	76	4	80
Negativo	4	78	82
Totale	80	82	162

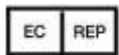
Accordo globale: $(154/162) \times 100 = 95.1\%$

Reattività Crociata

Pazienti ospedalizzati, infettati con patogeni del: *Neisseria gonorrhoea*, *Staphylococcus aureus* ed *Peptostreptococcus anaerobius* diagnosticati con kit serologici commerciali, sono stati testati anche con il kit SeroELISA Chlamydia. Dei sieri è risultata negativa, non si è rilevata alcuna cross-reattività significativa.

Bibliografia

1. **Yuan, Y., Zhang, Y. X., Watkins, N. G. and Caldwell, H.D.** (1989). Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. *Infection and Immunity*. **57**:1040-1049. Copyright 1989, American Society for Microbiology.
2. **Treharne J. D.** (1985). The community epidemiology of trachoma. *Rev Infect Dis*. **7**:760-763.
3. **Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V.** (1985). Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. *Eur. J. Epidemiol* **1**: 110-116.
4. **Wang, S.P., Grayston, J.T., Kuo, C.C., Alexander, E.R., and Holmes, K.K.** (1977). SeroDiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the microimmunofluorescence test. In: Nongonococcal urethritis and related infection, D. Hobson and K.K. Holmes (Eds), P. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 237-248.
5. **Thompson III S. E., and Dretler R. H.** (1982). Epidemiology and Treatment of Chlamydial Infections in Pregnant Women and Infants. *Review of Infectious Diseases* **4**:S747
6. **Saikka P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Ekman, M.R., Makela, P.H., and Valtonen, V.** (1988). Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infection. *Lancet* **II**: 983-986.
7. **Puolakkainen, M., Saikka, P., Leinonen, M., Nurminen, V., Vaananen, P. and Makela, P.H.** (1984). Chlamydia Pneumonitis and its Serodiagnosis in Infants. *J. Infect. Dis.* **149**:598-604.
8. **Grayson, J.G.** (1989). Chlamydia pneumoniae, Strain TWAR. *Chest* **95**:664-669.
9. **Gardner, P.S. Rapid Virus Diagnosis. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds).** Immunoassays for the 80s, pp. 353-360 MTP Press Limited 1981.
10. **Chantler, S. and Diment, J.A.** current Status of Specific IgM Antibody Assays. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds). Immunoassays for the 80s, pp. 417-430 MTP Press Limited 1981.
11. **Numazaki, K., Chiba, S., Yamanaka, T., Moroboshi, T., Aoki, K., Nakao, T.** (1985). Detection of IgM Antibodies against Chlamydia trachomatis by Enzyme Linked Fluorescence Immunoassay. *J.Clin. Pathol.* **38**:733-739



Obelis s.a. (European Authorized Representative Center)
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, Belgium
Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03
e-mail: mail@obelis.net