



SeroCP™ IgG

Imuno-ensaio Enzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG específicos de *Chlamydia pneumoniae* no soro humano

Manual de Instruções

Kit para 96 determinações
(Número de catálogo. A191-01M)

Kit para 192 determinações
(Número de catálogo. B191-01M)

Para ser utilizado em Diagnóstico *In Vitro*
Apenas para uso profissional
Conservar a 2-8°C. **Não congelar**

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Uso Indicado

O Kit SeroCP™ IgG é indicado para a detecção de anticorpos IgG específicos para *Chlamydia pneumoniae* no soro humano. O kit SeroCP™ IgG é um Imuno-ensaio Enzimático (ELISA) qualitativo, que é utilizado no diagnóstico de infecções por *Chlamydia pneumoniae*

Para ser utilizado em Diagnóstico *In Vitro*

Introdução

Chlamydia pneumoniae (TWAR) é um agente infeccioso emergente com um espectro de manifestações clínicas que incluem infecções do tracto respiratório superior e inferior (1). A maioria das infecções por *C. pneumoniae* são moderadas e assintomáticas, mas podem no entanto causar doenças graves, como faringite, sinusite, bronquite aguda e pneumonia adquirida por via comunitária. Infecções não detectadas e não tratadas podem conduzir a doenças prolongadas e persistentes. Dados recentes indicam uma possível associação entre a infecção por *C. pneumoniae* e doenças crónicas (2).

A seroprevalência de *C. pneumoniae* entre crianças é reduzida, aumentando acentuadamente até à meia-idade, e permanece alta até à velhice (>50%).

Dificuldades na recolha da amostra e inacessibilidade ao local de infecção afectam seriamente a utilidade dos métodos de detecção directa. Assim, testes serológicos são usados rotineiramente e funcionam como uma ferramenta não invasiva na identificação de infecções quer distais quer crónicas por Clamídia (3), onde os métodos de detecção directa raramente são eficientes (4). Para além disso, a presença de certos tipos de anticorpos poderá também indicar o estado da doença.

A infecção primária por Clamídia é caracterizada por uma resposta predominante de IgM em 2 a 4 semanas e uma resposta retardada de IgG e IgA em 6 a 8 semanas. Depois de infecções agudas por *C. pneumoniae*, os anticorpos IgM desaparecem geralmente em 2 a 6 meses (5); os títulos de anticorpos IgG normalmente decrescem lentamente, enquanto que anticorpos IgA tendem a desaparecer rapidamente (6). Quando existem suspeitas de infecção primária por clamídia, a detecção de IgM é altamente diagnosticável (7). No entanto, em infecções recorrentes ou crónicas a prevalência de IgM é reduzida e por isso a ausência de IgM não exclui necessariamente uma infecção em curso.

Em re-infecções, os níveis de IgG e IgA aumentam rapidamente, com frequência em uma a duas semanas (8).

Anticorpos IgA mostraram ser um marcador imunológico fiável de infecções primárias, crónicas e recorrentes. Normalmente, estes anticorpos baixam rapidamente para níveis basais no seguimento do tratamento e erradicação das infecções de Clamídia (3). A persistência de títulos elevados de anticorpos IgA é geralmente considerada como um sinal de infecção crónica (6).

Os anticorpos IgG persistem por longos períodos e declinam muito lentamente. Deste modo, a presença de anticorpos IgG é sobretudo indicativa de uma infecção de clamídia numa altura indeterminada. Contudo, um aumento de quatro vezes em IgG ou níveis altos de anticorpos IgG podem indicar uma infecção crónica em curso.

SeroCP™ é um ensaio baseado em ELISA no qual corpos elementares de *C. pneumoniae* (TWAR-183) purificados são usados como antígenos para detectar a resposta de anticorpos em humanos. Para o diagnóstico completo de infecções correntes, crónicas ou passadas, é recomendada a determinação de anticorpos IgG, IgM e IgA contra *C. pneumoniae*.

Princípio do Teste

- São fornecidas Placas SeroCP™ revestidas com antígenos de corpos elementares de *C.pneumoniae* (TWAR 183) purificados.
- O soro a ser testado é diluído e incubado na placa SeroCP™ por 1h a 37°C. Neste passo os anticorpos de *C.pneumoniae* ligar-se-ão aos antígenos imobilizados.
- Anticorpos não específicos são removidos durante as lavagens.
- Anti IgG humana conjugada com Peroxidase de Rábano (HRP) é adicionada e incubada por 1h a 37°C. Neste passo o Conjugado-HRP liga-se aos complexos antígeno-anticorpo previamente ligados.
- O conjugado não ligado é removido durante as lavagens.
- Com a adição do substrato TMB, o substrato é hidrolizado pela peroxidase, gerando uma solução azul do substrato reduzido.
- Com a adição da Solução de Paragem, a cor azul torna-se amarela e deverá ser lida num leitor de ELISA a um comprimento de onda de 450nm.
- A absorvância é proporcional à quantidade de anticorpos específicos que se encontram ligados aos antígenos do revestimento.

Procedimento do Ensaio

Adicionar 2x50µl de Controlo Negativo, 1x50µl de Controlo Positivo e amostras diluídas 1/105 aos poços das microplacas revestidos com antígenos de *C. pneumoniae*

↓
Cobrir a placa e incubar por 1h a 37°C com 100% de humidade

↓
Lavar 3 vezes com Tampão de Lavagem (300-350µl)

↓
Adicionar 50µl de Conjugado HRP diluído 1/300

↓
Cobrir a placa e incubar por 1h a 37°C com 100% de humidade

↓
Lavar 3 vezes com Tampão de Lavagem (300-350µl)

↓
Adicionar 100µl do Substrato TMB

↓
Cobrir a placa e incubar 15 min à temperatura ambiente

↓
Adicionar 100µl de Solução de Paragem

↓
Ler absorbância a 450nm

↓
Calcular e interpretar os resultados

Conteúdo do Kit

Kit para 96 determinações

(Número de catálogo. A191-01M)

1. **Microplaca revestida com antígenos de *C.pneumoniae*:** 96 poços separáveis (8x12) revestidos com antígenos de *C.pneumoniae*, embalados numa bolsa de alumínio contendo um cartão dessecante.
1 Placa
2. **Tampão de Lavagem Concentrado (20X):** Um tampão de PBS - Tween.
1 Frasco, 100ml
3. **Diluyente de Soro (azul):** Solução tampão pronta a usar. Contém menos de 0.05% proclina como conservante.
1 Frasco, 30ml
4. **Diluyente do Conjugado (verde):** Solução tampão pronta a usar. Contém menos de 0.05% proclina como conservante.
1 Frasco, 40ml
5. **Controlo Negativo:** Soro humano negativo para IgG contra *C.pneumoniae* pronto a usar. Contém menos de 0.05% de proclina e menos de 0.1% de Azida de Sódio como conservantes.
1 Frasco, 2.5ml
6. **Controlo Positivo:** Soro humano positivo para IgG contra *C.pneumoniae* pronto a usar. Contém menos de 0.05% de proclina e menos de 0.1% de Azida de Sódio como conservantes.
1 Frasco, 2ml
7. **Conjugado-HRP Concentrado (300X):** Anti IgG humana (específica para a cadeia gama) conjugada com Peroxidase de Rábano (HRP). Contém menos de 0.05% de proclina como preservantes.
1 Frasco, 0.2ml

8. **Substrato TMB:** Solução pronta a usar. Contém 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina como cromogénio e peróxido como substrato.
1 Garrafa, 14ml
9. **Solução de Paragem:** Solução pronta a usar. Contém H₂SO₄ 1M.
1 Garrafa, 15ml
10. **Cobertura da Placa:**
1 unidade
11. **Manual de Instruções:**
1

Kit Teste para 192 Determinações

Cat. No. B191-01M

1. **Microplaca revestida com antígenos de *C.pneumoniae*:** 96 poços separáveis (8x12) revestidos com antígenos de *C.pneumoniae*, embalados numa bolsa de alumínio contendo um cartão dessecante.
2 Placas
2. **Tampão de Lavagem Concentrado (20X):** Um tampão de PBS - Tween.
2 Frascos, 100ml cada
3. **Diluyente de Soro (azul):** Solução tampão pronta a usar. Contém menos de 0.05% proclina como conservante.
1 Frasco, 60ml
4. **Diluyente de Conjugado (verde):** Solução tampão pronta a usar. Contém menos de 0.05% proclina como conservante.
1 Frasco, 80ml
5. **Controlo Negativo:** Soro humano negativo para IgG contra *C.pneumoniae* pronto a usar. Contém menos de 0.05% de proclina e menos de 0.1% de Azida de Sódio como conservantes.
1 Frasco, 2.4ml
6. **Controlo Positivo:** Soro humano positivo para IgG contra *C.pneumoniae* pronto a usar. Contém menos de 0.05% de proclina e menos de 0.1% de Azida de Sódio como conservantes.
1 Frasco, 1.25ml
7. **Concentrado de conjugado-HRP (300X):** Anti IgG humana (específico para a cadeia gama) conjugada com Peroxidase de Rábano (HRP). Contém menos de 0.05% de proclina como conservante.
1 Frasco, 0.2ml
8. **Substrato TMB:** Solução pronta a usar. Contém 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina como cromogénio e peróxido como substrato.
1 Frasco, 24ml
9. **Solução de Paragem:** Solução pronta a usar. Contém H₂SO₄ 1M.
1 Frasco, 30ml
10. **Cobertura da Placa:**
2 unidades
11. **Manual de Instruções:**
1

Materiais Necessários mas não Fornecidos

1. Tubos de teste limpos para diluição dos soros dos pacientes.
2. Frasco de plástico descartável para diluição do conjugado-HRP concentrado.
3. Micropipetas ajustáveis ou pipetas de multicanaís (gamas de 5-50, 50-200 e 200-1000µl) e pontas descartáveis.
4. Frasco volumétrico de um litro.
5. Uma proveta de 50ml.
6. Garrafa de lavagem.
7. Papel absorvente.

8. Vortex
9. Banho de água a 37°C com tampa, ou uma câmara húmida colocada numa incubadora a 37°C.
10. Leitor de ELISA com filtro de 450nm.
11. Água destilada ou bi-desionizada.

Advertências e Precauções

Para utilização em Diagnóstico *In Vitro*

1. Este Kit contém soros humanos, os quais foram testados com técnicas aprovadas pela FDA & CE, e foram dados como negativos para HbsAg e para anticorpos contra HCV e VIH 1&2. Visto que nenhum método conhecido pode fornecer a garantia completa que produtos derivados de sangue humano não transmitam infecções, todos os componentes de sangue humano fornecidos neste kit devem ser manuseados como soro ou sangue potencialmente infecciosos, de acordo com as recomendações publicadas no manual do CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories" (Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos), 1998.
2. A solução do Substrato TMB é um material irritante para a pele e membranas mucosas. Evitar o contacto directo.
3. Todos os componentes deste kit foram calibrados e testados por lote. Não é recomendável misturar componentes de lotes diferentes pois tal pode afectar os resultados.
4. Ácido sulfúrico diluído (H₂SO₄ 1M) é um agente irritante para os olhos e a pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediatamente a área com água e consultar um médico.

Armazenamento e Validade dos Reagentes

1. Todos os reagentes fornecidos devem ser guardados entre 2 a 8°C. Os frascos de reagentes não abertos são estáveis até à data limite de validade indicada na embalagem do kit. A exposição de componentes fechados de origem ou selados à temperatura ambiente por algumas horas não deteriorará os reagentes. **NÃO CONGELAR!**
2. Uma vez aberto, o kit deve ser utilizado dentro de 90 dias.
3. Tiras não utilizadas devem ser seladas de novo na bolsa de alumínio com o cartão dessecante, enrolando a extremidade aberta e selando completamente com fita por cima de toda a extensão da abertura.
4. Poder-se-ão formar cristais no Tampão de Lavagem concentrado 20X durante armazenamento a baixas temperaturas. Isto é perfeitamente normal. Os cristais serão redissolvidos aquecendo o tampão a 37°C antes da diluição. Uma vez diluída, a solução pode ser guardada entre 2 a 8°C por um período de vinte e um dias.

Recolha de Soro

Preparar soros a partir de amostras recolhidas assepticamente recorrendo a técnicas standard. Soros inactivados por calor não deverão ser usados. Não é recomendável o uso de soros lipémicos, túrbidos ou contaminados. Partículas ou precipitados nos soros podem causar resultados erróneos. Este tipo de amostras deve ser clarificado por centrifugação ou filtração antes do teste.

Conservação de Amostras

As amostras devem ser conservadas entre 2 a 8°C e testadas em 7 dias (a adição 0.1% de Azida de Sódio é altamente recomendada). Se um período de conservação maior for antecipado, congelar alíquotas a temperaturas iguais ou inferiores a -20°C. Evitar descongelações e congelações repetidas.

Procedimento do teste - Manual

Protocolo para automatização, disponível sob requisição

A. Preparação dos Reagentes

1. Deixar todos os componentes e amostras clínicas a testar atingir a temperatura ambiente. Misturar bem o Controlo Positivo, Controlo Negativo e amostras clínicas antes da sua utilização.
2. Determinar o número total de amostras a testar. Para além das amostras, devem ser incluídos em cada teste dois poços de Controlo Negativo e um poço de Controlo Positivo.
3. Retirar a microplaca da bolsa de alumínio cortando uma extremidade próxima do selo. Deixar o número necessário de tiras (de acordo com o total de amostras a testar) na placa de 96 poços.
4. Diluir o Tampão de Lavagem Concentrado 1/20 com água destilada ou bi-desionizada. Por exemplo, para preparar um litro de Tampão de Lavagem, adicionar 50ml do Tampão de Lavagem Concentrado a 950ml de água destilada ou bi-desionizada.

B. Incubação de amostras de soro e controlos

5. Diluir cada soro de paciente numa proporção de 1/105 com o Diluente de Soros fornecido do seguinte modo: Adicionar 10µl do soro do paciente a 200µl de Diluente de Soros (1/21) e em seguida diluir novamente adicionando 25µl da diluição 1/21 a 100µl de Diluente de Soros.
6. Dispensar 50µl do Controlo Positivo, Controlo Negativo e dos soros diluídos de 1/105 em poços separados da tira de teste. **O Controlo Negativo deve ser pipetado para dois poços separados.**
7. Cobrir as tiras com a cobertura da placa e incubar por 1h a 37°C numa câmara húmida.
8. Rejeitar o conteúdo líquido dos poços.
9. **Passo de Lavagem:** Encher completamente cada poço com Tampão de Lavagem (300-350µl) e rejeitar o líquido, repetindo este passo três vezes.
10. Secar as tiras e o suporte batendo-as gentilmente contra papel absorvente limpo.

C. Incubação com o conjugado

11. O concentrado de Anti IgG humana conjugado com HRP deve ser diluído para a solução de trabalho pouco antes de ser usado. Diluir o concentrado de Anti IgG humana conjugada com HRP numa proporção de 1/300 com diluente do conjugado. Por exemplo, para duas tiras, preparar um mínimo de 3ml de conjugado-HRP (10µl de concentrado de Anti IgG humana

conjugada com HRP é adicionado a 3ml de Diluente do Conjugado).

12. Dispensar 50µl de conjugado diluído em cada poço.

13. Cobrir as tiras com a cobertura da placa e incubar durante 1h a 37°C numa câmara húmida.

14. Rejeitar o conteúdo líquido e lavar como acima descrito nos passos 9 e 10.

D. Incubação com o Substrato TMB

15. Dispensar 100µl de Substrato TMB em cada poço, cobrir as tiras com a cobertura da placa e incubar à temperatura ambiente por **15 minutos**.

16. Parar a reacção adicionando 100µl de Solução de Paragem (H₂SO₄ 1M) a cada poço.

E. Determinação dos Resultados

17. Determinar a absorvância a 450nm e registar os resultados. A determinação dos resultados não deverá exceder 30 minutos após a paragem da reacção cromogénica.

Nota: Quaisquer bolhas de ar devem ser removidas antes da leitura. O fundo da placa de ELISA deverá ser limpo cuidadosamente.

Validação do Teste

Para que o teste seja válido os seguintes critérios devem ser satisfeitos. Se estes critérios não forem satisfeitos o teste deverá ser considerado inválido e ser repetido.

- Controlo Positivo:** O valor de absorvância deve ser: ≥ 0.8 a 450nm.
- Controlo Negativo:** O valor de absorvância média do Controlo Negativo deve ser: $0.1 < CN \leq 0.4$ a 450nm.

Cálculo do Valor de Cut Off (VCO) e do Índice de Cut Off (ICO)

O valor de *cut-off* é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$VCO = CN \times 2$$

CN = A absorvância média a 450nm do Controlo Negativo corrido em duplicado.

De modo a normalizar os resultados obtidos em testes diferentes, o índice de *cut-off* é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$ICO = \frac{\text{Absorvância da amostra de soro a 450nm}}{VCO}$$

Interpretação dos Resultados

Tabla 1:

Absorvância (450nm)	ICO	Resultado	Interpretação do Diagnóstico
O.D < VCO	<1.0	Negativo Anticorpos IgG não detectáveis	Nenhuma indicação de infecção corrente por <i>C.pneumoniae</i>
$VCO \leq O.D \leq 1.1 \times VCO$	1-1.1	Indeterminado Níveis baixos de anticorpos IgG	Indicação de possível exposição a <i>C.pneumoniae</i> . É requerido um segundo teste a amostra após 2-4 semanas ¹ .
O.D > 1.1 x VCO	>1.1	Positivo níveis de anticorpos IgG relevantes	Indicação de infecção corrente ou passada por <i>C.pneumoniae</i> ²

- Quando se testar uma segunda amostra, devem ser testadas em simultâneo a primeira e a segunda amostras. Se um resultado indeterminado é obtido novamente a amostra deve ser considerada negativa.
- De modo a diferenciar entre infecções correntes e infecções crónicas é recomendada a colheita de uma segunda amostra após 2 a 4 semanas. Se o ICO da segunda amostra aumentar em, pelo menos, 40% tal indica uma infecção corrente.

Para obter um perfil de anticorpos mais abrangente, IgA e IgM devem ser também testados

Tabla 2

Interpretação de resultados baseada nas combinações de anticorpos IgG, IgA e IgM.

Níveis de anticorpos anti <i>C.pneumoniae</i>			Interpretação dos Resultados
IgM	IgG	IgA	
Negativo	Negativo	Negativo	Nenhuma indicação de infecção por <i>C.pneumoniae</i> .
Positivo	Negativo ou Positivo	Negativo ou Positivo	Indicação de infecção corrente.
Negativo	Positivo	Negativo	Indicação de infecção passada ou corrente.
Negativo	Positivo ou Negativo	Positivo	Indicação de infecção corrente ou crónica.

Limitações do Teste

1. Nenhum teste serológico isolado deverá ser usado para um diagnóstico definitivo. Todos os dados clínicos e laboratoriais devem ser tomados em linha de conta.
2. Amostras obtidas demasiado cedo durante infecção primária podem não ter anticorpos detectáveis. Se se suspeita de uma infecção a Clamídia, uma segunda amostra deve ser obtida após 2 a 4 semanas e testada em paralelo com a amostra original.

Características de Desempenho

Tabla 3

Comparação do SeroCP™ IgG com teste de microimunofluorescência (MIF) *in house*

O SeroCP™ IgG foi avaliado comparativamente a testes MIF realizados *in house*.

O estudo foi efectuado num centro médico usando 63 amostras de soro de doentes sintomáticos e 35 amostras de soro de indivíduos saudáveis.

MIF \ SeroCP™	Positivo	Negativo	Total
Positivo	60	1	61
Negativo	3	34	37
Total	63	35	98

Sensibilidade: $60/63 \times 100 = 95\%$

Especificidade: $34/35 \times 100 = 97\%$

Concordância Global: $94/98 \times 100 = 96\%$

Precisão

Dentro de cada Ensaio

Amostra	N.º de Réplicas	Valor Médio	VC%
Positivo	10	1.196	3.8
Negativo	10	0.160	4.6

Entre Ensaios

Amostra	N.º de Réplicas	Valor Médio	VC%
Positivo	10	1.152	5.9
Negativo	10	0.165	6.4

Bibliografia

1. Myhra, W., Mordhors, C.H., Wang, S.P., Grayston, J.T., (1990). Clinical features of *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in Denmark 1975-1987. In: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, et al., eds. Chlamydial infections. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 422-425.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary

heart disease in the Helsinki heart study. Ann. Intern. Med. 116: 273-278.

3. Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Hocberg, G., Potashnik, G., Sarov, B. and Insler, V. (1986). Specific IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in infertile women. In: J. Fertil. 31 (3): 193-197.
4. Campbell, L.A. (1993). PCR detection of *Chlamydia pneumoniae* In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
5. Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic evolution of serum *chlamydia* antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.
6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Eckman, 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 Infarction. Lancet. 2: 983-986.
7. Grayston, J.T., Campbell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-625.
8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.



European Authorized

Representative:

MedNet EC-REP GmbH

Borkstrasse 10,

48163 Muenster, Germany



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003

ISRAEL

Tel.: +(972).8.8562920

Fax: +(972).8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Symbols for IVD components and Reagents	
	Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Manufacturer
	Store at 2°C – 8°C
	Expiry Date
	Warning
	Danger
	Contains Sufficient for 96 tests
	Consult Instructions for Use
	CE mark
	EU Authorized representative
	Batch Number