



Chlamydia IgA SeroFIA™

Test in Immunofluorescenza per la determinazione di anticorpi IgA specifici per *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* and *C. psittaci* nel siero umano

Istruzioni per l'uso

Test kit per 3 X 105 determinazioni

Catalogo No. 513-01

Per uso diagnostico **In Vitro**

Solo per uso professionale

Conservare a 2-8°C. **Non congelare**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Applicazioni

Chlamydia IgA SeroFIA™ è un test semiquantitativo in immuno-fluorescenza per la determinazione differenziale di IgA specifiche per *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* e *C. psittaci* in un singolo campione di siero umano.

Per uso diagnostico **in vitro**.

Introduzione

Chlamydia, un batterio Gram-negativo altamente specializzato consiste di quattro specie: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* (TWAR), *C. psittaci* e *C. pecorum*.

C. trachomatis include 15 serotipi che condividono epitopi immunogenici a vari livelli.

C. trachomatis è una delle maggiori cause di malattie sessualmente trasmesse ed è associata all'uretrite non gonococcica (NGU) e all'epididimite nell'uomo e a cervicite, uretrite e malattia infiammatoria pelvica nelle donne, alla sindrome di Reiter in soggetti aploipo HLA-B27 e a congiuntivite e polmonite neonatale nel neonato (2-6).

C. pneumoniae è un importante patogeno respiratorio dell'uomo e causa fino al 10% dei casi di polmonite acquisita in comunità. E' stata associata a malattie respiratorie acute, polmonite, asma, bronchite, faringite, sindrome toracica acuta dell'anemia falciforme, malattia cardiaca coronarica, e sindrome di Guillain-Barre (7-9).

C. psittaci infetta una diversa gamma di specie ospiti dai molluschi agli uccelli, ai mammiferi ed anche causa

polmonite grave. I test serologici sono impiegati di routine per la diagnosi di infezioni clamidiali. Servono da strumenti non invasivi nell'identificazione di infezioni clamidiali sia distali sia croniche (10, 11), dove i metodi di rilevazione diretta sono raramente efficaci. Inoltre, la presenza di alcuni tipi di anticorpi può anche indicare lo stato della malattia. L'infezione primaria da clamidia è caratterizzata da una risposta predominante IgM entro 2-4 settimane e da una risposta ritardata IgG e IgA entro 6-8 settimane. Dopo infezione acuta da *C. pneumoniae*, gli anticorpi IgM vengono di solito persi entro 2 - 6 mesi (12), i titoli di anticorpi IgG si alzano e poi decrescono lentamente mentre le IgA tendono a scomparire rapidamente (13).

Le re-infezioni da Chlamydia sono caratterizzate da assenza di risposta IgM e pronte risposte IgG e IgA (9). Gli anticorpi IgA si sono dimostrati un marker immunologico affidabile di infezioni primarie croniche e ricorrenti. Questi anticorpi di solito declinano rapidamente a valori basali in seguito a trattamento ed eradicazione dell'infezione da clamidia (1-6, 10, 11).

La persistenza di elevati titoli di anticorpi IgA è generalmente considerata un segno di infezione cronica (13). In uno studio condotto su pazienti anziani con infezioni respiratorie è stato stimato che un quinto dei casi di *C. pneumoniae* sarebbe stato perso senza la determinazione delle IgA (14). Gli anticorpi IgG persistono per lunghi periodi e declinano molto lentamente. Quindi la presenza di anticorpi IgG è principalmente indicativa di un'infezione da clamidia in un tempo indeterminato. Comunque un aumento del titolo degli anticorpi IgG di 4 volte o alti livelli di IgG possono indicare un'infezione in corso, cronica o sistemica. Chlamydia SeroFIA™ di Savyon è un test di micro-IF basato sui principi della MIF. SeroFIA™ usa come antigene Corpi Elementari purificati di *C. pneumoniae* (TW-183), *C. trachomatis* (L2) e *C. psittaci* (SZ-1). Ogni vetrino di Chlamydia IFI contiene 3 file di 7 pozzetti, ciascuna fila contiene una sola delle tre specie di antigeni *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* o *C. psittaci*. Questa separazione degli antigeni delle tre specie previene ogni possibile confusione tra le specie stesse e rende l'interpretazione dei risultati semplice ed esente da errore.

Principio del Test

- Corpi elementari purificati (EB) di *C. pneumoniae* (C.pn), *C. trachomatis* (C.tr) e *C. psittaci* (C.ps) sono fissati nei pozzetti dei vetrini SeroFIA™, ogni specie in una fila diversa del vetrino.
- I sieri diluiti dei pazienti vengono incubati per 30 minuti a 37°C in ciascuna fila con i rispettivi antigeni.
- Le componenti sieriche non legate sono rimosse con il lavaggio.
- Ad ogni pozzetto si aggiungono anti-IgA umane coniugate con fluoresceina e si fa incubare per 30 minuti a 37°C.
- Il coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio.
- I vetrini vengono asciugati e montati aggiungendo 3 gocce di Fluido di Montaggio.
- I vetrini sono esaminati usando un microscopio a fluorescenza. Le reazioni positive appaiono come brillanti EB verde-mela fluorescenti contro un fondo scuro.

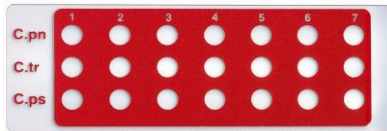
- Determinazioni qualitative si ottengono con un'unica diluizione del siero. Risultati semi-quantitativi si raggiungono con titolazioni a termine.

Contenuto del Kit

1. Vetrini di reazione (3x7 pozzetti/unità)

I vetrini sono rivestiti con antigeni di *C.pneumoniae*, *C.trachomatis* e *C.psittaci*, ciascuno su file diverse. Ogni vetrino è confezionato in busta di alluminio contenente un pacchetto di silica gel.

15 unità



2. Tampone di lavaggio concentrato (20X)

Un tampone PBS-Tween, (pH 7.4-7.6) che contiene NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ and Tween 20.

1 flacone, 100ml

3. Diluente del siero: Un tampone PBS, che contiene gelatina, albumina di siero bovino, MgCl₂ e sodio azide <0.1%.

1 flacone, 80ml

4. Controllo Negativo: Siero umano negativo per anticorpi IgG, IgA e IgM contro *C.pneumoniae*, *C.trachomatis*, *C.psittaci*. Contiene sodio azide <0.1%. Pronto per l'uso.

1 flacone, 0,5ml

5. Controllo Positivo per *C.trachomatis*: Siero umano positivo per anticorpi IgA contro *C.trachomatis*. Contiene sodio azide <0.1%. Pronto per l'uso.

1 flacone, 0,2ml

6. Controllo Positivo per *C.pneumoniae*: Siero umano positivo per anticorpi IgA contro *C.pneumoniae*. Contiene sodio azide <0.1%. Pronto per l'uso.

1 flacone, 0,2ml

7. Controllo Positivo per *C.psittaci*: Siero umano positivo per anticorpi IgA contro *C.psittaci*. Contiene sodio azide <0.1%. Pronto per l'uso.

1 flacone, 0,2ml

8. Coniugato-FITC: anticorpi di coniglio fluoresceinati (catena α -spezifici) anti-IgA umane. Pronto per l'uso.

1 flacone, 3,3ml

9. Fluido di montaggio: contiene sodio azide <0.1%

1 flacone contagocce, 1,5ml

10. Coprioggetti : 1 confezione

11. Istruzioni per l'uso 1

Materiali richiesti ma non forniti:

1. Micropiastre pulite o provette per la diluizione dei sieri dei pazienti.
2. Centrifuga clinica.
3. Micropipette regolabili (5-50, 50-200, 200-1000 microlitri) e puntali monouso.
4. Cilindro graduato (1 litro).
5. Vortex mixer.

6. Bagnomaria a 37°C con coperchio o camera umida in termostato a 37 °C
7. Vassoio di plastica per incubazione dei vetrini.
8. Acqua distillata o bi-deionizzata per diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato.
9. Spruzzetta.
10. Portavetrini e recipiente per colorazione.
11. Timer.
12. Microscopio a fluorescenza con filtri appropriati per leggere fluorescenza-FITC e con ingrandimenti a 40x, e 100x.

Avvertenze e Precauzioni:

Per Uso Diagnostico *in Vitro*

1. Questo kit contiene siero umano che è stato testato con metodiche approvate dall'FDA, CE, ed è risultato negativo per HBsAg, e per anticorpi verso HCV e 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 infetto, secondo le raccomandazioni pubblicate nel manuale del CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988
2. Il materiale antigenico clamidiale che riveste i vetrini è stato inattivato e non contiene organismi viventi rilevabili. Comunque, siccome nessun metodo conosciuto può offrire assicurazione completa che il prodotto derivato da organismi patogeni non trasmetta infezione, i vetrini dovrebbero essere manipolati ed eliminati come qualsiasi materiale a potenziale rischio biologico, secondo le raccomandazioni del manuale del CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 1988.
3. La sodio azide può formare azidi esplosivi con il piombo o rame dei tubi di scarico. Per prevenire l'accumulo di queste sostanze, sciacquare con grandi quantità d'acqua lavandino e tubature dopo aver gettato soluzioni contenenti azide. Evitare comunque lo scarico in lavandino.
4. Non pipettare a bocca.
5. Evitare il contatto con la pelle di qualsiasi reagente in questo kit .
6. Indossare guanti monouso per pipettare i sieri ed eseguire il test. Lavare bene le mani dopo aver tolto i guanti.
7. Qualsiasi attrezzatura, liquido o altra sostanza venga in contatto diretto con siero umano va considerata potenzialmente contaminata e va sterilizzata o inattivata dopo l'uso e prima di essere eliminata o pulita. L'inattivazione può essere ottenuta per autoclavaggio a 121 °C per almeno 1 ora, o per trattamento con una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% per almeno 30 minuti.
8. Il coniugato-FITC contiene Blue Evans che è un cancerogeno. Evitare il contatto con la pelle e gli occhi.
9. Il mezzo di montaggio contiene ingredienti corrosivi. Evitare il contatto con la pelle e non inalare. In caso di contatto con pelle e occhi sciacquare immediatamente con molta acqua.

Conservazione e Stabilità dei Reagenti

Tutti i materiali forniti dovrebbero essere conservati a 2-8°C. Se conservati a 2-8°C i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare componenti del kit oltre la scadenza.

L'esposizione delle componenti del kit a temperatura ambiente per alcune ore non causa danno ai reagenti.

Non esporre i reagenti a luce intensa. Non congelare i reagenti.

Raccolta e Preparazione dei campioni

Raccolta dei campioni di siero

I campioni di siero dovrebbero essere raccolti asepticamente usando metodiche standard. Non si dovrebbero usare sieri inattivati al calore. L'uso di sieri torbidi, lipemici o contaminati non è raccomandabile. Materiale particolato e precipitati nei sieri possono causare risultati errati. Tali campioni dovrebbero essere chiarificati per centrifugazione o filtrazione prima del test.

Conservazione

I campioni dovrebbero essere conservati a 2-8°C e saggiati entro 7 giorni (con 0,1% di sodio azide (NaN₃) come conservante). Per una conservazione più lunga, aliquote del siero dovrebbero essere conservate a -20 °C.

Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Preparazione del Campione

Per screening iniziale diluire i sieri 1:32 in Diluente del Siero, aggiungendo 10µl di siero a 310µl di Diluente del Siero. Per determinare titoli a termine, diluire serialmente in Diluente del Siero iniziando da 1:32.

Procedimento del Test

Note:

Per ogni serie, si raccomanda di usare un pozzetto per il Controllo Negativo e uno per ciascun Controllo Positivo di C.pneumoniae, C.trachomatis e C.psittaci nelle rispettive file.

Controllo Positivo può essere usato come controllo di titolo a termine se diluito 1:128.

1. Portare vetrini, reagenti e sieri dei pazienti a temperatura ambiente prima di iniziare il test.
2. Diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato 1:20 aggiungendo 50ml di Tampone di Lavaggio Concentrato a 950ml di acqua bi-deionizzata o di acqua distillata. Il tampone diluito può essere conservato a 2-8°C fino a 2 settimane
3. Pipettare 10µl di controlli o siero diluito negli appropriati pozzetti di ciascuna delle tre file.
4. Incubare i vetrini in camera umida a 37 °C per 30 minuti.
5. Rimuovere i vetrini dalla camera umida e risciacquare delicatamente ogni vetrino con un getto di Tampone di Lavaggio diluito usando una spruzzetta.
Lavare i vetrini immergendoli in un contenitore da colorazione contenente Tampone di Lavaggio diluito. Lasciare in immersione per 10 minuti.

Immergere i vetrini in acqua distillata. Rimuoverli e asciugare con aria.

6. Pipettare 10µl di Coniugato-FITC in ogni pozzetto.
7. Incubare a 37 °C per 30 minuti.
8. Ripetere risciacqui e lavaggi dei vetrini come al punto 5.
9. Mettere 3 gocce di Fluido di Montaggio lungo il centro di ciascun vetrino. Coprire con i Coprioggetti. Rimuovere le bolle d'aria premendo leggermente sul coprioggetti.
10. Leggere i risultati su un microscopio a fluorescenza a ingrandimento di 400x or 1000x. Per risultati migliori leggere i vetrini lo stesso giorno di esecuzione del test. Se non fosse possibile, i vetrini montati possono essere conservati al buio a 2-8°C fino a 3 giorni.

Validità del Test

Perchè il test sia valido devono essere rispettati i seguenti criteri. Se questi criteri non sono rispettati il test dovrebbe essere considerato non valido e dovrebbe essere ripetuto.

1. I Controlli Positivi mostrano fluorescenza da moderata a intensa color verde mela dei Corpi Elementari di Chlamydia della specie corrispondente.
2. Il Controllo Negativo mostra reattività trascurabile con tutte le specie.

Interpretazione e Significato dei Risultati

Si raccomanda di leggere per primi i pozzetti di controllo per assicurare la corretta interpretazione dei risultati. Leggere la fluorescenza dei campioni e graduarla come segue:

- | | |
|---|--|
| + | Fluorescenza dei Corpi Elementari verde mela da moderata a intensa o diffusa. |
| ± | Fluorescenza dei Corpi Elementari attenuata ma visibile da considerarsi come titolo finale .
Il titolo finale di un siero è definito come l'ultima diluizione che ancora da una colorazione visibile. La diluizione successiva darà un quadro identico al siero negativo. |
| - | Nessuna fluorescenza o debole fluorescenza di fondo senza chiara morfologia di clamidia |

Fluorescenza osservata a titolo 1:32			Interpretazione
C.pn	C.tr	C.ps	

+	-	-	Presenza di anticorpi IgA specifici rispettivamente per C.pn, C.tr o C.ps. Un titolo 1:32 è considerato evidenza presunta di infezione.
-	+	-	
-	-	+	

+	+	-	Presenza di anticorpi IgA per Chlamidia. Può indicare infezione multipla o cross-reattività inter-specie. Per determinare la specie predominante eseguire titolazione a termine.
-	+	+	
+	-	+	
+	+	+	

-	-	-	Negativo. Anticorpi IgA per C.pn, C.tr, C.ps non rilevabili
---	---	---	---

Note:

1. In rari casi può essere osservata una colorazione chiara e densa di particelle molto piccole (più piccole dei Corpi Elementari). Ciò può essere dovuto a reattività per l'LPS.

Si dovrebbero determinare IgG e IgM o un secondo campione prelevato dopo 2-3 settimane.

Se IgG e IgM sono negative e il risultato IgA si ripete, i campioni vengono considerati negativi.

Significato dei Titoli a Termine

Se sono richiesti risultati semi-quantitativi o se si rileva reattività (colorazione fluorescente) con più di una specie di clamidia, l'antigene con il titolo a termine più elevato (di almeno 4 volte) indica la specie di clamidia che si suppone responsabile per l'infezione.

Limitazioni del Test

1. Nessun singolo test serologico dovrebbe essere usato per la diagnosi finale. Tutti i dati clinici e di laboratorio dovrebbero essere considerati.
2. Campioni prelevati troppo precocemente durante un'infezione primaria, possono non contenere anticorpi rilevabili. Se si sospetta infezione da clamidia, si dovrebbe prelevare un secondo campione 2-3 settimane più tardi e testarlo in parallelo con il campione originale.
3. La reattività del siero con più di una specie di clamidia può essere dovuta a esposizione a più di una specie o ad anticorpi cross-reattivi.
4. Le ottiche del microscopio e le condizioni e il tipo della sorgente di luce possono influenzare la determinazione della intensità di fluorescenza globale e dei titoli a termine.

Caratteristiche diagnostiche

Gli studi sono stati eseguiti presso un centro medico indipendente su pazienti sospettati di avere *C.trachomatis*, *C. pneumoniae* o *C. psittaci*.

Risultati per *Chlamydia trachomatis* ottenuti con IgA SeroFIA™ in confronto ad un metodo MIF di riferimento

MIF \ SeroFIA™	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	11	6	17
Negativo	2	52	54
Totale	13	58	71

Sensibilità: $11/13 \times 100 = 84.6 \%$

Specificità: $52/58 \times 100 = 89.7 \%$

Concordanza: $63/71 \times 100 = 88.7 \%$

Risultati per *Chlamydia pneumoniae* ottenuti con IgA SeroFIA™ in confronto ad un metodo MIF di riferimento

MIF \ SeroFIA™	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	39	0	39
Negativo	0	74	74
Totale	39	74	113

Sensibilità: $39/39 \times 100 = 100 \%$

Specificità: $74/74 \times 100 = 100 \%$

Concordanza: $113/113 \times 100 = 100 \%$

Risultati per *Chlamydia psittaci* ottenuti con IgA SeroFIA™ in confronto ad un metodo MIF di riferimento

MIF \ SeroFIA™	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	1	4	5
Negativo	1	24	25
Totale	2	28	30

Specificità: $24/28 \times 100 = 88 \%$

Concordanza: $25/30 \times 100 = 83 \%$

La Sensibilità non può essere determinata a causa del basso numero di campioni positivi.

Bibliografia

1. 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.
2. Tsunekawa, T. and Kumamoto, Y. (1989) A study of IgA and IgG titers of C.trachomatis in serum and prostatic secretion in chronic prostatitis. J.J.A. Inf. Dis. 63(2): 130-137.
3. Kaneti, J. et al (1988) IgG and IgA antibodies specific for Chlamydia trachomatis in acute epididymitis. Europ. Urol. 14: 323-327.
4. Kletter, Y., Caspi, D., Yarom, M., Sarov, B., Sarov I., and Tanay, A. (1988) Serum IgA and IgG Antibodies Specific to Chlamydia in Patients with Rieter's Syndrome (RS) In: Proceedings of The European Society for Chlamydia Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, p.170.
5. Stutman, H.R., Rettig, P.J. and Reyes, S. (1984) Chlamydia trachomatis as a cause of Pneumonitis and pleural effusion. J. Pediat. 104: 588-591.
6. Paran, H., Heimer, D. and Sarov, I. (1986) Serological, clinical and radiological findings in adults with broncho- pulmonary infections caused by Chlamydia trachomatis. Isr. J.Med. Sci. 22: 823-827.
7. Grayston J. T., Campbell, L.A., Kuo, C.C., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D.H. and Wang, S.P. (1990). A new respiratory tract pathogen. Chlamydia pneumoniae strain TWAR. J. Infect. Dis. 161:618-625.
8. Hahn D. L., Dodge, R. W. and Golubjatnikow, R. (1991). Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. JAMA 266: 225-230
9. Saikku 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.
10. Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Holcberg, G., Potashnik, G., Sarov, B. and Insler, V. (1986) Specific IgG and IgA antibodies to Chlamydia trachomatis in infertile women. Int. J. Fertil. 31 (3): 193-197.
11. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984) Chlamydia pneumoniae and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
12. Grayston, J.T., L.A. Campbell, C.H. Mordhorst, P. Saikku, D. Thom and S.P. Wang. (1989) A New Respiratory Pathogen: Chlamydia pneumoniae Strain TWAR. J.Inf.Dis. 161: 618-25
13. Saikku, P.,M. Leinonen, L. Tenkanen, E. Linnanmaki, M-R Ekman, V. Manninen, M. Manttari, M.H. Frick, J.K. Huttunen. (1992) Chronic Chlamydiae pneumoniae Infection as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.

14. Leinonen, M., H. Sryjala, P. Kujala and P. Saikku. (1991). Serological diagnosis of Chlamydiae pneumoniae)Cpn(pneumoniae in adults. In: Abstracts of 31st ICAAC, Chicago, Illinois, Sept 29 - Oct 2, 1991. Washington, D.C. Aner. Soc. Microbiol, p.209.

Glossary of Symbols:

Symbols for IVD components and Reagents			
	Manufacturer		In vitro diagnostic medical device
	EU Authorized representative		Consult instructions for use
	Contains Sufficient for <n> tests		Temperature limitation
	Catalogue Code		Use by Date
	Batch Number		CE mark



European Authorized Representative:
MedNet EC-REP GmbH
Borkstrasse 10,
48163 Muenster, Germany