



savyonDIAGNOSTICS

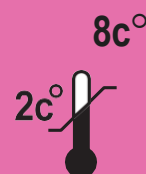
SeroCP™ IgM

REF A192-01

ELISA per la determinazione
di anticorpi IgM specifici per
Chlamydia pneumoniae nel
siero umano

Solo per uso professionale

IVD



0483

SeroCP™ IgM

Applicazioni

SeroCP™-IgM è un kit immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione di anticorpi IgM specifici per *Chlamydia pneumoniae* nel siero umano. Il test consente la diagnosi precoce di infezione corrente con un singolo campione di siero mediante la determinazione di anticorpi IgM.

Per Uso Diagnostico **In Vitro**.

Introduzione

Chlamydia pneumoniae (TWAR) è uno dei nuovi agenti infettivi emergenti con uno spettro di manifestazioni cliniche che include manifestazioni a carico del tratto respiratorio superiore e inferiore (1). La maggioranza delle infezioni da *C.pneumoniae* sono blande e asintomatiche, tuttavia possono causare malattie gravi quali faringiti, sinusiti, bronchiti acute e polmoniti acquisite in comunità. Infezioni non rilevate e non trattate possono portare a malattia prolungata e persistente. Dati recenti indicano una possibile associazione tra infezione da *C.pneumoniae* e malattie croniche (2).

La sieroprevalenza di *C.pneumoniae* tra i bambini è bassa, aumenta bruscamente fino alla mezza età e rimane elevata negli anziani (>50%). Difficoltà nella raccolta del campione e l'inaccessibilità del sito di infezione compromettono seriamente l'utilità dei metodi di rilevazione diretta. Quindi, i test serologici sono usati di routine e servono come strumento non invasivo per l'identificazione di infezioni clamidiali sia distali sia croniche (3), quando i metodi diretti sono scarsamente efficienti (4). Inoltre, la presenza di alcuni tipi di anticorpi può anche indicare la fase 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 un'infezione acuta da *C.pneumoniae*, gli anticorpi IgM di solito spariscono entro 2-6 mesi (5), i titoli anticorpali IgG di solito diminuiscono lentamente; mentre gli anticorpi IgA tendono a diminuire rapidamente (6). Quando si sospetta un'infezione primaria, la ricerca delle IgM ha grande valore diagnostico (7). Comunque, nelle reinfezioni e nelle infezioni croniche, la prevalenza delle IgM è bassa e quindi l'assenza di IgM non esclude necessariamente un'infezione in atto.

Nelle reinfezioni i livelli di IgG e IgA aumentano rapidamente, spesso in una o due settimane (8). Gli anticorpi IgA si sono rivelati un marker immunologico affidabile di infezione primaria, cronica e ricorrente. Questi anticorpi di solito declinano rapidamente ai livelli basali a seguito di trattamento ed eradicazione dell'infezione da clamidia (3).

La persistenza di titoli elevati di IgA è generalmente considerata un segno di infezione cronica (6).

Gli anticorpi IgG persistono a lungo e calano lentamente. Quindi, la presenza di IgG è principalmente indicativa di un'infezione da clamidia sviluppata in un tempo indeterminato. Comunque un titolo quadruplicato delle IgG o alti livelli di IgG possono indicare una infezione cronica in atto.

SeroCP™ è un ELISA in cui corpi elementari purificati di *C.pneumoniae* (TWAR-183) sono usati come antigeni per rilevare la risposta immunitaria nell'uomo. Per una diagnosi completa di infezione corrente, cronica o passata, si raccomanda di determinare IgG, IgM e IgA verso *C.pneumoniae*.

Principio del Test

- I pozzetti di SeroCP™ sono forniti rivestiti con corpi elementari purificati di *C.pneumoniae* (TWAR 183).
 - Il siero da analizzare viene diluito e incubato nei pozzetti per 1h a 37°C. In questo passaggio gli anticorpi anti *C.pneumoniae* vengono legati agli antigeni immobilizzati.
 - Gli anticorpi non specifici vengono rimossi con un lavaggio.
 - Si aggiungono anti-IgM umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP) e si incubano 1h a 37°C. In questo passaggio il coniugato-HRP si lega al complesso antigene-anticorpo preformato.
 - Il coniugato non legato viene rimosso con un lavaggio.
 - Si aggiunge un substrato-TMB che viene idrolizzato dalla perossidasi, producendo una soluzione blu di substrato ridotto.
 - Su aggiunta della Soluzione di Arresto il colore blu vira al giallo e viene letto in un lettore per ELISA a 450nm.
 - L'assorbanza è proporzionale alla quantità di anticorpi specifici che sono legati agli antigeni fissati nei pozzetti.
-

Procedimento del Test

Dispensare 2 x 50µl di Controllo Negativo, 1x50µl di Controllo Positivo e di campioni diluiti nei pozzetti di micropiastra rivestiti con antigeni di *C.pneumoniae*

↓
Coprire la piastra e incubare 1h a 37°C con 100% di umidità

↓
Lavare 3 volte con Tampone di Lavaggio (300-350µl)

↓
Aggiungere 50µl di coniugato HRP diluito 1/300

↓
Coprire la piastra e incubare 1h a 37°C con 100% di umidità

↓
Lavare 3 volte con Tampone di Lavaggio (300-350µl)

↓
Aggiungere 100µl di Substrato-TMB

↓
Coprire la piastra e incubare 15min a temperatura ambiente

↓
Aggiungere 100µl di Soluzione d 'Arresto

↓
Leggere l'assorbanza a 450nm

↓
Calcolare e interpretare i risultati

Contenuto dei kit

Test kit per 96 Determinazioni

Cat. No. A192-01

1. **Micropiastra rivestita con antigeni di *C.pneumoniae*:** 96 pozzetti separabili (8x12) rivestiti con antigeni di *C.pneumoniae*, confezionati in busta di alluminio contenente un dessiccante.
1 micropiastra
2. **Tampone di Lavaggio concentrato (20X):** un tampone PBS-Tween.
1 flacone, 100ml
3. **Diluyente del siero-IgM (rosso):** Una soluzione tamponata di anti-IgG umane pronta per l'uso. Contiene meno dello 0,05% di Proclin quale conservante.
2 flacone, 60ml
4. **Diluyente del coniugato (verde):** Una soluzione tampone pronta per l'uso. Contiene meno dello 0,05% di Proclin.
2 flacone, 20ml
5. **Controllo Negativo:** Un siero umano, pronto per l'uso, negativo per le IgM anti-*C.pneumoniae*. Contiene meno dello 0,05% di Proclin e meno dello 0,1% di sodio azide come conservanti.
1 flacone, 2,5ml

6. **Controllo Positivo:** Un siero umano, pronto per l'uso, positivo per IgM anti-*C.pneumoniae*. Contiene meno dello 0,05% di Proclin e meno dello 0,1% di sodio azide come conservanti.
1 flacone da 2,0ml
7. **Coniugato-HRP Concentrato (300X):** Anti-IgM umane (catene μ specifiche) coniugate con perossidasi di rafano (HRP). Contiene meno dello 0,05% di Proclin.
1 flacone, 0,2ml
8. **TMB-Substrato:** Una soluzione pronta per l'uso contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina come cromogeno e perossido di idrogeno quale substrato.
1 flacone, 16ml
9. **Soluzione d'Arresto:** Una soluzione pronta per l'uso. Contiene H_2SO_4 1M.
1 flacone, 16ml
10. **Istruzioni per l'uso** **1 unità**
-

Materiali Necessari Ma Non Forniti

1. Provette pulite per la diluizione dei sieri dei pazienti.
 2. Provetta di plastica monouso per la diluizione del coniugato HRP concentrato.
 3. Micropipette regolabili o multicanale (5-50,50-200 e 200-1000µl) e puntali monouso.
 4. Flacone graduato da un litro.
 5. Cilindro graduato da 50ml.
 6. Spruzzetta.
 7. Carta assorbente.
 8. Vortex mixer.
 9. Bagnomaria a 37°C con coperchio, o camera umida in un termostato a 37°C
 10. Lettore ELISA con filtro a 450nm.
 11. Acqua distillata o bi-deionizzata.
-

Avvertenze e Precauzioni

Per Uso Diagnostico in Vitro

1. Questo kit contiene siero umano che è stato testato con metodiche approvate dall'FDA e CE, 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.
 2. La soluzione TMB-Substrato è irritante per la pelle e le mucose. Evitare il contatto diretto.
 3. Tutte le componenti di questo kit sono state calibrate e testate per lotto. Non è raccomandabile mescolare componenti da lotti diversi in quanto potrebbe influenzare i risultati.
 4. La soluzione di acido solforico (H_2SO_4 1M) è irritante per gli occhi e per la pelle. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.
 5. Alcuni reagenti contengono sodio azide la cui quantità risulta all'interno dei limiti di concentrazione consentiti. Tuttavia, a causa dell'alta tossicità di questa sostanza, manipolare con estrema cautela, evitando ogni contatto diretto.
-

Conservazione e durata dei reagenti

1. Tutti i reagenti forniti devono essere conservati a 2-8°C. I flaconi non aperti sono stabili fino alla scadenza indicata in etichetta. L'esposizione di componenti ancora sigillate a temperatura ambiente per alcune ore non causa danno ai reagenti. **NON CONGELARE!**
2. Una volta aperto il kit ha una scadenza di 90 giorni.
3. Le strisce di pozzetti non utilizzate vanno risigillate nella busta di alluminio con il dessiccante, arrotolando l'estremità aperta e sigillando l'intera larghezza dell'apertura con nastro adesivo.
4. 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.

Prelievo dei Campioni di Siero

Preparare i sieri da campioni raccolti asetticamente usando metodiche standard. Non usare siero inattivato al calore. L'uso di siero lipemico, torbido o contaminato non è raccomandabile. Materiali particolati e precipitati nel siero possono causare risultati erranei. Tali campioni dovrebbero essere chiarificati per centrifugazione o filtrazione prima del test.

Conservazione dei campioni

I campioni devono essere conservati a 2-8°C e saggiati entro 7 giorni (si raccomanda di aggiungere sodio azide 0,1%). Se si prevede una conservazione più lunga, aliquotare e conservare i campioni sotto -20°C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

Procedimento del test

A. Preparazione dei Reagenti

1. Portare tutte le componenti e i campioni a temperatura ambiente. Mescolare bene il Controllo Positivo, il Controllo Negativo e i campioni prima dell'uso.
2. Determinare il numero totale di campioni da analizzare. In aggiunta ai campioni, includere ogni volta due pozzetti per il Controllo Negativo e uno per il Controllo Positivo.
3. Estrarre la micropiastra dalla sua busta di alluminio tagliando un'estremità vicino al sigillo. Lasciare le strisce necessarie (secondo il numero di campioni da analizzare) nel portastrisce da 96 pozzetti.
4. Diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato 1/20 con acqua bi-deionizzata o distillata. **Per esempio**, per preparare un litro di Tampone di Lavaggio, aggiungere 50ml del Tampone di Lavaggio Concentrato a 950ml di acqua bi-deionizzata o distillata.

B. Incubazione dei campioni di siero e dei controlli

5. Diluizione con un solo passaggio: Diluire ogni campione 1:105 con il Diluente del Siero fornito come segue: aggiungere 5µl di siero a 520µl di Diluente del Siero.
Diluizione in due tempi: Diluire ogni campione 1/105 con il Diluente del Siero fornito come segue: aggiungere 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.
6. Dispensare 50µl di Controllo Positivo, Controllo Negativo e sieri diluiti 1/105 in pozzetti separati. **I controlli negativi vanno dispensati in doppio.**
7. Coprire le strisce con un copripiastre e incubare per 1h a 37°C in una camera umida.
8. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti.
9. **Lavaggio:** Riempire ciascun pozzetto con tampone di lavaggio (300-350µl) ed eliminare il liquido, Ripetere questo passaggio due volte per un totale di tre lavaggi.
10. Asciugare strisce e portastrisce sbattendole con attenzione su carta assorbente pulita.

C. Incubazione con il coniugato

11. Il Coniugato-Anti IgM umane-HRP concentrato deve essere diluito a soluzione di lavoro subito prima dell'uso. Diluire 1/300 il coniugato Anti IgM umane-HRP concentrato con diluente del coniugato. Per esempio, per due strisce preparare un minimo di 3ml di coniugato-HRP diluito (10µl di Coniugato-HRP Concentrato mescolato con 3ml di Diluente del Coniugato).
12. Dispensare 50µl di coniugato diluito in ciascun pozzetto.
13. Coprire le strisce con un copripiastre e incubare per 1h a 37°C in una camera umida.
14. Eliminare il liquido e lavare come descritto ai punti 9-10.

D. Incubazione con il Substrato-TMB

15. Dispensare 100µl di Substrato-TMB in ogni pozzetto coprire le strisce e incubare a temperatura ambiente per **15 minuti**.
16. Fermare la reazione aggiungendo 100µl di Soluzione d'Arresto (H₂SO₄ 1M) in ogni pozzetto.

E. Determinazione dei Risultati

17. Determinare l'assorbanza a 450nm e registrare i risultati. La lettura non dovrebbe essere fatta oltre i 30 minuti dall'arresto della reazione cromogena.
Nota: *Qualsiasi bolla d'aria deve essere rimossa prima della lettura. Il fondo della piastra ELISA deve essere pulito con cura.*
-

Validazione del Test

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

1. **Controllo Positivo:** Il valore dell'assorbanza dovrebbe essere $\geq 0,8$ a 450nm.
2. **Controllo Negativo:** La media delle assorbanze dei Controlli Negativi dovrebbe essere $0,1 < NC \leq 0,4$ a 450nm.

Calcolo del Cut-Off (COV) e del Cut-Off Index (COI)

Il valore di cut-off è calcolato in base alla formula seguente: **COV = NC x 2**

NC = La media delle assorbanze del Controllo Negativo a 450nm usato in duplicato.

Per normalizzare i risultati ottenuti in sedute analitiche diverse, si calcola il cut-off index secondo la seguente formula:

$$\text{COI} = \frac{\text{Assorbanza del campione di siero a 450nm}}{\text{COV.}}$$

Interpretazione dei Risultati

Tabella 1: Correlazione tra l'assorbanza a 450nm e la presenza di anticorpi IgM anti-C.pneumoniae

Assorbanza (450nm)	COI	Risultati	Interpretazione Diagnostica
O.D < 1.4xCOV	<1.4	Negativo corrente da Nessuna indicazione di Anticorpi IgM rilevabili	Nessuna indicazione di infezione C.pneumoniae
1.4xCOV ≤ O.D ≤ 1.5xCOV	1.4-1.5	Borderline Bassi livelli di anticorpi IgM	Indicazione di possibile esposizione a C.pneumoniae Si richiede un secondo campione dopo 2-4 settimane ¹
O.D > 1.5xCOV	>1.5	Positivo rilevanti livelli di anticorpi IgM	Indicazione di infezione corrente da C.pneumoniae

1. In caso di risultati borderline si dovrebbe prelevare un secondo campione 2-4 settimane più tardi per analizzarlo assieme al primo campione. Se si ottiene un secondo valore borderline, il campione va considerato negativo.

Per ottenere un profilo anticorpale completo si dovrebbero testare anche IgG e IgA.

Tabella 2: Interpretazione dei risultati basata sulla combinazione degli anticorpi IgG, IgA e IgM.

Livelli degli anticorpi anti- <i>C.pneumoniae</i>			Interpretazione dei Risultati
IgM	IgG	IgA	
Negativo	Negativo	Negativo	Nessuna indicazione di infezione da <i>C.pneumoniae</i>
Positivo	Negativo o Positivo	Negativo o Positivo	Indicazione di infezione corrente
Negativo	Positivo	Negativo	Indicazione di infezione corrente o passata
Negativo	Positivo o Negativo	Positivo	Indicazione di infezione corrente o cronica

Limitazioni del Test

1. Non usare un singolo test serologico per formulare la diagnosi finale. Tutti i dati clinici e di laboratorio dovrebbero essere considerati.
2. I campioni ottenuti troppo precocemente durante un'infezione primaria possono non contenere anticorpi rilevabili.
Se si sospetta infezione da clamidia, si dovrebbe fare un secondo prelievo 2-4 settimane più tardi per analizzarlo in parallelo al campione originale.

Caratteristiche

Tabella 3: Confronto di SeroCP™-IgM con Chlamydia IgM SeroFIA™.

SeroCP™-IgM è stato valutato in confronto con Chlamydia IgM SeroFIA™ (Savyon Diagnostics Ltd. Cat.No. 512-01).

Lo studio è stato effettuato presso due centri medici usando 113 campioni di siero da soggetti sintomatici (33) e bambini sani (80).

SeroFIA™ SeroCP™	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	30	4	34
Negativo	3	76	79
Totale	33	80	113

Sensibilità: $30/33 \times 100 = 91\%$

Specificità: $76/80 \times 100 = 95\%$

Concordanza: $106/113 \times 100 = 94\%$

Precisione

Intra-assay (intra-serie)

Campione	No. di Replicati	Valore Medio	CV%
Positivo	10	1.469	2.3
Negativo	10	0.236	4.7

Inter-assay (inter-serie)

Campione	No. di Replicati	Valore Medio	CV%
Positivo	10	0.605	5.4
Negativo	10	0.163	6.0

Bibliography

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
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. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984). Chlamydia pnemonitis and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
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., Leinon, 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., Cambell, 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., Mannin, 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.



Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL
Tel.: +(972).8.8562920
Fax: +(972).8.8523176
E-mail: support@savyondiagnostics.com



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

Symbols for IVD components and Reagents	
	Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Manufacturar
	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