



## IPAZyme™ Chlamydia IgG/IgA

Test indiretto di immunoperossidasi per la determinazione di anticorpi IgG specifici e di anticorpi IgA specifici per *Chlamydia* nel siero umano

### Istruzioni per l'uso

Kit per 144 determinazioni  
(Catalogo No. 011-01)

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@savyondiagnosics.com](mailto:support@savyondiagnosics.com)

## Informazioni generali

### Applicazioni

Il test Savyon CHLAMYDIA IPAZYME è inteso per la determinazione e titolazione di anticorpi specifici IgG e IgA anti Chlamydia nel siero umano.

Per uso diagnostico in vitro.

### Introduzione

Chlamydia è un batterio parassita con un genoma di 660X106 dalton (1-5). Il genere Chlamydia comprende due specie: Chlamydia trachomatis (CT) e Chlamydia psittaci, l'agente che causa la sifilide. Tutti i membri di Chlamydia condividono un comune antigene genere specifico che è un glicolipide (6). I ceppi CT condividono antigeni specie e tipo specifici in diversi gradi. Quattro di 15 serotipi (A, B, Ba e C) causano tracoma oftalmico endemico, responsabile di milioni di casi di cecità nei paesi in via di sviluppo; otto ceppi (da D a K) sono responsabili di infezioni clamidiali sessualmente trasmesse; tre ceppi (L1, L2 e L3) sono responsabili del linfogranuloma venereo (LGV) (7).

E' ora evidente che CT (ceppi da D ad K) è la principale causa di infezioni sessualmente trasmesse, quali l'uretrite non-gonococcica (NGU), l'uretrite post gonococcica (PGU), epididimite, cervicite, endometrite, salpingite, periepatite, peritonite, Sindrome di Reiter, congiuntivite e polmonite (rivista da Sweet et al (10). Studi eseguiti in Europa, negli USA e in Israele hanno dimostrato che CT è la maggiore causa di salpingite. E' stato stimato con metodi colturali e/o serologici che 58% in Svezia e 23% negli U.S.A. dei casi di salpingite acuta sono associati a concomitanti infezioni genitali da

clamidia (11,13). I Titolo di anticorpi anti Chlamydia correlano con la gravità dell'infiammazione tubarica (come osservato in laparoscopia) e con la durata dei dolori all'addome inferiore prima che venga richiesta l'attenzione del medico (11,14). Inoltre, precedenti infezioni da CT (principalmente sub-cliniche) sono correlate con circa un terzo-due terzi dei casi di infertilità tubarica. Le procedure usate nella diagnosi delle infezioni da clamidia comprendono l'isolamento in colture cellulari, il rilevamento di Chlamydia direttamente su strisci con test in immunofluorescenza, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), e/o metodi serologici per la determinazione di anticorpi per CT, quali la Fissazione del Complemento (CF), la MicroImmunoFluorescenza (MIF), test ImmunoEnzimatici (EIA) radioimmunoassay (illustrati da Evans and Woodland (15) and by Treharne et al (16)).

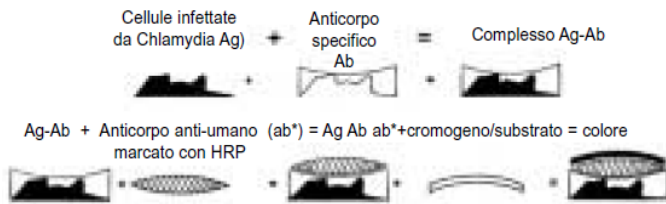
Uno dei problemi nell'isolamento di CT come test diagnostico standard, è il fatto che non può essere eseguito in tutte le infezioni da CT. Per esempio, nel caso di salpingite e infertilità meccanica dovuta a CT, l'agente di solito non può essere isolato dai lavaggi delle tube di Fallopio. In una certa percentuale dei pazienti, CT può essere identificata da campioni bioptici (14, 30). In vari studi recenti è stata sostenuta la possibilità (11,14,17-23) che elevati titoli di anticorpi specifici IgG e IgA anti Chlamydia possano servire quali marker per il rilevamento precoce di infezione attiva da CT. Anticorpi anti CT particolarmente elevati sono stati trovati in infezioni croniche o sistemiche, quali salpingite, infertilità meccanica, periepatite (Sindrome Fitz-Hugh-Curtis), e polmonite (11-14,17-21, 24, 25, 33). E' stato dimostrato, che la presenza di anticorpi IgA anti CT è significativamente più alta nella uretrite nongonococcica (NGU)(isolamento positivo), in donne con salpingite acuta e in donne con infertilità meccanica, quando confrontata con i relativi controlli (21, 26-28). La disponibilità di marker serologici per le infezioni da CT riduce la necessità di procedure invasive nella diagnosi.

Le infezioni genitali causate da CT sono spesso asintomatiche, e la rilevazione precoce di queste infezioni ha un valore reale in quanto esistono trattamenti efficaci (p.es., tetraciclina, eritromicina) che possono prevenire CT dal raggiungere o danneggiare il tratto genitale superiore. E' possibile che lo screening della popolazione totale possa essere economico se si considera la riduzione possibile dei costi per i trattamenti di infertilità. Gli anticorpi sia IgG sia IgA possono essere usati per monitorare con efficienza la situazione clinica dei pazienti soggetti a trattamento clinico delle infezioni da CT. Savyon Diagnostics Ltd. propone un metodo di immunoperossidasi indiretto che impiega cellule infettate da CT serotipo L2 come antigene per la determinazione di anticorpi IgG specifici anti CT e di anticorpi IgA specifici anti CT. Il serotipo L2 possiede un antigene con grande reattività e si stima reagisca con il 95.5% dei sieri umani positivi per anticorpi anti CT in test di immunofluorescenza indiretta (IFA) (8). Questo test può essere eseguito in quasi tutti i laboratori clinici in quanto economico e facile da eseguire.

### Principio del test di Immunoperossidasi indiretto

I passaggi del procedimento sono i seguenti: Nel primo passaggio, il siero umano da testare è messo a contatto con il materiale antigenico (cellule infettate da Chlamydia trachomatis). Gli anticorpi, se presenti nel siero, si attaccheranno all'antigene, formando un complesso antigene-anticorpo. Se il siero esaminato non contiene anticorpi per questo particolare antigene, non si formano complessi e tutte le componenti seriche sono lavate via nella fase di risciacquo. Il secondo passaggio prevede l'aggiunta di perossidasi di rafano (HRP) coniugata con anti-IgG umane (catena gamma specifiche) o anti-IgA umane (catena alfa specifiche). Se nel

primo passaggio si era formato un complesso antigeno-anticorpo, l'anticorpo marcato con perossidasi si legherà al complesso nel secondo passaggio. In una reazione positiva, un precipitato blu all'interno delle cellule infettate può essere osservato con l'aiuto di un ordinario microscopio ottico a seguito della reazione enzimatica della perossidasi con perossido di idrogeno e un adatto reagente cromogeno.



### Materiali Forniti

1. Vetrini da 12X12-pozzetti con cellule infettate da Chlamydia trachomatis.
2. 1 flacone da 0.5 ml di controllo positivo (siero umano positivo per anticorpi IgA anti Chlamydia).
3. 1 flacone da 0.5 ml di controllo positivo (siero umano positivo per anticorpi IgG anti Chlamydia).
4. 1 flacone da 0.5 ml di controllo negativo (siero umano negativo per anticorpi IgG, IgA e IgM anti Chlamydia).
5. 1 flacone da 1.0 ml di coniugato HRP-anti-IgA umane (catena alfa specifiche) (di coniglio).
6. 1 flacone da 1.0 ml di coniugato HRP-anti-IgG umane (catena gamma specifiche) (di coniglio).
7. 1 flacone da 2.0 ml di cromogeno/substrato.
8. 1 flacone da 4.0 ml di mezzo di montaggio.
9. 1 X 100 ml di Tampone IPAzyme concentrato.
10. 3 strisce di carta assorbente.
11. 15 coprivetrini.
12. Modulo Dati dei Sieri di Controllo.
13. Istruzioni per l'uso.

### Conservazione e Stabilità dei Reagenti

Tutti i materiali forniti, eccetto i Coprioggetti, dovrebbero essere conservati a 2°-8°C. Comunque un'esposizione di qualche ora a temperatura ambiente non causerà danno ai reagenti. Non congelare. Se viene mantenuta una temperatura costante di conservazione (2°-8°C) i reagenti nei flaconi originali intatti saranno stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta. L'insieme dei reagenti nel kit sarà stabile fino alla data indicata sull'etichetta del kit stesso. Quando un kit è aperto, la scadenza è da considerarsi di 60 giorni dalla prima apertura.

### Precauzione

1. IL MATERIALE ANTIGENICO IN QUESTO KIT E' STATO FISSATO E NON CONTIENE ORGANISMI VIVENTI RILEVABILI. COMUNQUE, I VETRINI DOVREBBERO ESSERE MANIPOLATI ED ELIMINATI COME QUALSIASI ALTRO MATERIALE DI LABORATORIO OTENZIALMENTE A RISCHIO BIOLOGICO.
2. I componenti da siero umano sono stati saggiati con metodi approvati dall'FDA e trovati negativi per HBsAg e per gli anticorpi anti HIV 1&2. Questo non assicura l'assenza di HBsAg o HIV 1&2. Quindi le componenti contenenti siero umano e i campioni di siero dei pazienti

M011-011 03-06/2014

dovrebbero essere manipolati ed eliminati come qualsiasi altro materiale di laboratorio potenzialmente a rischio biologico.

3. Tutti i componenti di questo kit sono stati testati e standardizzati come insieme. Non mescolare componenti da kit di lotti diversi o di altri produttori.
4. Per uso diagnostico in vitro.

### Materiali Richiesti Ma Non Forniti

1. Provette e portaprovette per la diluizione dei campioni di siero.
2. Micropipette regolabili (10, 20, 60 e 300 microlitri) e puntali monouso attrezzatura per pipettaggio in sicurezza.
3. Bagnomaria a 37°C con coperchio o camera umida in un termostato a 37°C.
4. Vassoio porta vetrini
5. Microscopio ottico, x200 ingrandimenti e filtro blu
6. Beuta volumetrica da 1000ml
7. Spruzzetta
8. Acqua bi-deionizzata o distillata per la diluizione del Tampone IPAzyme concentrato.

### Raccolta dei campioni

I campioni di siero dovrebbero essere prelevati, conservati a 2°C-8°C con sodio azide (NaN<sub>3</sub>) allo 0.2% come conservante, se devono essere testati entro alcuni giorni. Per periodi più lunghi, i campioni dovrebbero essere conservati a -20°C. Sebbene gli effetti dell'emolisi e/o torbidità sul test non siano stati esaminati, si raccomanda di analizzare solo campioni limpidi e non emolizzati.

### Procedura del Test

#### Note:

1. L'operatore dovrebbe essere esperto nella pratica di laboratorio.
2. Tutti i reagenti dovrebbero raggiungere Temperatura Ambiente prima dell'uso.
3. Sieri di controllo positivi and negativi control devono essere inclusi in ogni serie di test (basta su un solo vetrino).
4. Il modulo dei Dati dei Sieri di Controllo consente un auto-controllo delle performance del test.
5. Usare puntali monouso. Evitare crosscontaminazione tra reagenti.

### Procedura

1. Rimuovere il numero richiesto di vetrini dalle loro buste e porli in un vassoio.
2. Preparare le seguenti diluizioni di ciascun siero con il Tampone IPAzyme:  
1:16 - (20 microlitri di siero +300 microlitri di tampone IPAzyme )  
1:64 - (20 microlitri di siero diluito 1:16 + 60 microlitri di tampone IPAzyme.)  
1:128 - (20 microlitri di siero diluito 1:64 + 20 microlitri di tampone IPAzyme.)  
Usare la diluizione 1:16 per IgA e le diluizioni 1:64 e 1:128 per IgG.
3. Pipettare in ciascun pozzetto 10 microlitri di siero di controllo o di siero dei pazienti diluito.
4. Mettere I vetrini in una camera umida o in bagnomaria\* e incubare a 37° C per 45 minuti.

\* Fare particolare attenzione alla chiusura dell'incubatore, altrimenti i reagenti pipettati asciugheranno durante l'incubazione. Evitare il gocciolamento dell'acqua di condensa dal coperchio sui vetrini.

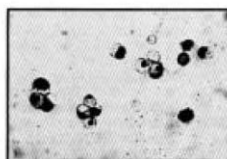
5. Sciacquare bene i vetrini, o con un leggero getto di tampone IPAzyme con una spruzzetta, o in un contenitore per colorazioni pieno di tampone IPAzyme muovendo i vetrini su e giù.
6. Asciugare i vetrini sulla carta assorbente come segue: pressare la superficie con i pozzetti del vetrino revemente e delicatamente sulla carta (non strusciare). Tamponare 2 volte, ogni volta su un tratto asciutto della carta, e poi irare il vetrino, se ancora non completamente asciutto, ripetere questo passaggio. Se si preferisce, si possono asciugare i vetrini con aria compressa invece che su carta,
7. Pipettare 10 microlitri di coniugato-HRP in ogni pozzetto. Mettere i vetrini in camera umida o in bagnomaria e incubare a 37° C per 45 minuti.
8. Ripetere i passaggi 5 e 6
9. Pipettare 10 microlitri di soluzione cromogeno/substrato in ogni pozzetto. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.
10. Ripetere i passaggi 5 e 6.
11. Mettere quattro piccole gocce di mezzo di montaggio su ogni vetrino e coprire con un coprioggetti. Evitare di intrappolare bolle d'aria tra vetrino e coprivetrino.
12. Leggere i vetrini lo stesso giorno a un ingrandimento 10x20. Si raccomanda di usare un filtro blu quando si osservano i risultati.

#### Note:

1. Si raccomanda di determinare i risultati finali a 10x20. - Altri ingrandimenti possono essere devianti
2. Nel caso il mezzo di montaggio contami il microscopio, si consiglia di pulire immediatamente con un panno umido.

#### Osservazione dei risultati

La presenza di un precipitato blu nelle cellule infettate indica una reazione positiva. L'assenza di un precipitato blu nelle cellule infettate indica una reazione negativa in questo test. Nessun precipitato blu dovrebbe svilupparsi nelle cellule non infettate. Qualsiasi colore blu compaia nelle cellule infettate a confronto con quelle non infettate dovrebbe essere considerato positivo.



(+)Positivo

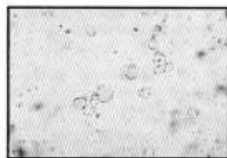
ingrandimento 10x20



(+)Positivo



(±)Dubbio



(-)Negativo

#### Interpretazione dei Risultati

Test	Diluizione	Risultati possibili							
		1	2	3	4	5	6	7	8
IgG	1:64	+	+	+	+	+	+	-	-
IgG	1:128	+	+	-	-	±	-	-	-
IgA	1:16	+	-	+	±	-	-	+	-

#### Significato dei risultati

1. Indicazione di infezione attiva
2. indicazione di infezione attiva
3. indicazione di infezione attiva
4. limite dell'infezione attiva
5. Positivo
6. Positivo
7. possibilità rara: ripetere il test
8. Negativo (o positivo basso sotto la sensibilità di questo test)

#### Note:

Se il risultato ricade nelle categorie 5, 6, 7 or 8, si raccomanda di testare un altro campione dopo 10 giorni.

Se il risultato ricade nella categoria 4, ripetere il test IgA a diluizione 1:8. I possibili risultati sono indicati nella tabella seguente:

	IgA 1:8	IgA :16 (±)	categoria
Se	+	allora +	3
Se	-	allora -	6
Se	±	allora -	6

#### Osservazioni:

- A. Queste osservazioni si basano su uno studio di pazienti ospedalizzati per malattia infiammatoria pelvica (PID) e controlli in Israele. Si raccomanda di riconfermare il significato dei risultati basati su un solo campione, con la determinazione del normale livello anticorpale nell'area geografica e nella specifica popolazione esaminata
- B. Si raccomanda di usare questo test per pazienti PID. Comunque è pensabile che risultati simili siano ottenibili nell'infertilità meccanica, nelle infezioni sistemiche da CT (polmonite, periepatite), e in altre infezioni croniche.
- C. Nel caso di infezione di mucose superficiali (p.es. uretrite non gonococcica) può generarsi una diversa risposta immune.
- D. Per studi sierologici o screening di popolazione un titolo di 1:32 per le IgG dovrebbe anche essere preso in considerazione.

#### Limitazioni

1. Se tutte le cellule, comprese quelle non infettate, mostrano una reazione positiva, il risultato del test non è valido. Nell'IPA eseguito con IPAzyme CHLAMYDIA, questo fenomeno è raro e correlato al siero, probabilmente causato da uno stato di malattia non collegabile o aggiuntivo all'infezione da clamidia, p.es. anticorpi anti-nucleo, antimitocondrio o reazioni non specifiche inspiegabili. (31,32).
2. L'interpretazione dei risultati in PID si basa su un numero limitato di diluizioni del siero. Si incoraggia l'allestimento di ulteriori serie di diluizioni del siero.

3. Il test si basa su immunoperossidasi su singolo antigene (L2). (L2) contiene determinanti antigenici esistenti negli altri 14 serotipi di CT come pure l'antigene di gruppo. Sebbene le cellule siano state infettate da CT del serotipo L2, con questo IPA possono essere rivelati anticorpi anti Chlamydia psittaci e Acinetobacter calcoaceticus.
4. Se vengono fatte diluizioni seriali si può determinare il titolo degli anticorpi IgG o IgA misurato con questo IPA. Comunque nessun test serologico dovrebbe essere usato come unico criterio di diagnosi. Tutti i dati clinici e di laboratorio devono essere considerati incluso il profilo chemoterapeutico del paziente già soggetto a trattamento.
5. Eccesso di lipidi nel siero può produrre una reazione "pellicola" causata da lipidi che si appiccicano in modo non specifico al vetro e sono difficili da rimuovere. Questa reazione, sebbene rara, può essere osservata lungo i bordi dei pozzetti dove il siero viene a contatto con il rivestimento del vetrino. Questa reazione, essendo aspecifica, dovrebbe essere ignorata. Solo la reazione osservata nell'area centrale del pozzetto dovrebbe essere considerata per il risultato del test.

## Bibliografia

1. Sarov, I and Becker Y. (1968). RNA in Elementary Bodies of Trachoma agent. Nature 217: 849-852.
2. Sarov, I. and Becker Y. (1969). Trachoma Agent DNA. J. Mol. Biol. 42:581-589.
3. Hatch, T.P. Host Free Activities of Chlamydia. In Mardh, P.A. et al. (Eds.). Chlamydial Infections, pp 25-28. Elsevier Biomedical Press, 1982.
4. Weiss, E. (1965). Adenosine Triphosphate and Other Requirements for the Utilization of Glucose by Agents of the Psittacosis-Trachoma Group. J. Bacteriol. 90: 243-253.
5. Moulder, J.W. (1984). Looking at Chlamydia Without Looking at Their Hosts. ASM News 50:353-362.
6. Kuo, C.C., Chen, H.H., Wang, S.P. and Grayston, J.T. (1986). Identification of a New Group of Chlamydia *Psittaci* Strains Called TWAR. J. Clin. Microbiol. 24:1034-1037.
7. Marrie, T.J., Grayston, J.T., Wang, S.P. and Kuo, C.C. (1987). *Pneumoniae* Associated with the TWAR Strain of Chlamydia. Ann. Int. Med. 106:507-511.
8. Dhir, S.P., Hakomori, S., Kenny, G.E. and Grayston, J.T. (1972). Immunochemical Studies on Chlamydia Group Antigen (Presence of a 2-Keto-3-Deoxycarbohydrate as Immunodominant Group). J. Immunol. 109:116-122.
9. Wang, S.P., Grayston, J.T. Micro-Immunofluorescence Antibody Responses in Chlamydia *trachomatis* Infection, a Review. In Mardh, P.A. et al. (Eds.). Chlamydial Infections. Pp. 301-316. Elsevier Biomedical Press 1982.
10. Ladany, S. and Sarov I (1985). Recent advances in Chlamydia *trachomatis* Eur. J. Epidemiol. 1:235-256.
11. Mardh, P-A, Lind, I., Svensson, L., Westrom, L. and Moller, B.R. (1981), Br. J. Vener. Dis. 57:125.
12. Piura, B., Kleinman, D., Sarov, I., Cevenini, R., Lieberman, J.R., Cahana, A., Chaim, W. and Insler V. (1984), Isr. J. Med. Sci. 20:486.
13. Sweet, R.L., Drpaer, D.L., Schachter, J., James J., Hadley, W.K. and Brooks, G.F. (1980), Am. J. Obstet. Gynecol. 138:985.
14. Henry-Suchet, J., Catalan, F., Paris, X and Loffredo, V. (1982), in: Chlamydia Infections, Mardh, P-A et al (Eds) Elsevier Biomedical Press, pp 183-187.
15. Evans, R.T. and Woodland, R.M. (1983), Br. Med. Bull. 39:181.
16. Treharne, J.D., Forsey, T. and Thomas B.J. (1983), Br. Med. Bull. 39:194.
17. Trehane, J.D., Ripa, K.T., Mardh, P.A., Svensson, L., Westorm, L. and Darougar, S. (1979) Br. J. Vener. Dis. 55:26.
18. Simmons, P.D. Forsey, T., Thin, R.M., Threharne, J.D., Darougar, S., Langlet, F. and Pandhi, R.K. (1979) Br. J. Vener. Dis. 55:419
19. Darougar, S., Forsey, T., Wood, J.J., Bolton, J.P. and Allan, A. (1981) Br. J. Vener. Dis. 57:391
20. Wang., S-P, Eschenbach, D.A., Holmes, K.K., Wager, G and Grayson, J.T. (1980), Am.J. Obstet. Gynecol. 138:1034.
21. Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Holcberg, ., Potashnik, G., Sarov, B. and Insler V., Int. J. Fertil, in Press.
22. Moore, D.E., Foy, H.M., Daling, J.R., Grayston, J.T., Spadoni, L.R., Wang, S-P, Kuo, C-C and Eschenbach, D.A. (1982), Lancet 2:574.
23. Jones, R.B., Ardery, B.R., Hui, S.L. and Cleary, R.E. (1982), Fertil, steril. 38:553.
24. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vannanen, P. and Makela, P.H. (1984). J. Infect. Dis. 149:598.
25. Schachter, J., Grossman, M. and Azimi, P.H. (1982), J. Infect. Dis. 146:530.
26. Sarov, I., Insler, V., Sarov, B., Cevenini, R., Rumpianesi, F., Donati, M., Kleinman D., Piura, B., Lieberman, J., Kimmel, N., Friedman, M. and La Placa, M. (1984), in: New Horizons in Microbiology, Elsevier Biomedical Press, ed. Sanna, A and Morace, G., p. 157.
27. Cevenini, R., Sarov, I., Rumpianesi, F., Donati, M., Melega, C., Varotti, C., La Placa M. (1984), J. Clin. Pathol. 37:186.
28. Leinonen, M., Saikku, P., Nurminen, M. Wahlstrom, E., Puolakkainen, M. And Makela, P.H. (1983), First European Congress of Clinical Microbiology, Bologna, p. 309.
29. Thompson, S.E. and Dretler, R.H. (1982), Rev. Infect. Dis. (suppl.) 4:S747.
30. Mardh, P-A, Ripa, T., Svensson, L. and Westrom, L., (1977), N. Engl. J. Med. 296:1377.
31. Holborow, E.J. Weir, D.M. and Johnson, G.D. (1957), Brit. Med. J. 11:732.
32. Berg, P.A., Roitt, I.M., Doniach, D. and Cooper, H.M. (1969). Immunol. 17:281.
33. Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim W. And Insler, V: Serum IgG and IgA antibodies specific for chlamydia trachomatis in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. Eur. J. Epidemiol. 1 (2), 110, 1985.



**European Authorized Representative: Obelis s.a.**

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels

Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: [mail@obelis.net](mailto:mail@obelis.net)