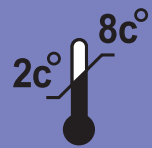


SeroCP™ Quant IgG

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) per la determinazione semi-quantitativa di anticorpi IgG specifici per *Chlamydia pneumoniae* nel siero umano

Solo per uso professionale

IVD



SeroCP™ Quant IgG

Applicazioni

SeroCP™ Quant IgG è un Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) per la determinazione semiquantitativa di anticorpi IgG specie specifici anti *Chlamydia pneumoniae* nel siero umano.

Solo per uso diagnostico *In Vitro*.

Introduzione

Chlamydia pneumoniae (TWAR-183) è uno dei nuovi agenti infettivi emergenti con uno spettro di manifestazioni cliniche che includono, infezioni del tratto respiratorio superiore e inferiore (1).

La maggioranza delle infezioni da *C.pneumoniae* sono leggere, asintomatiche e quindi difficili da diagnosticare. *C.pneumoniae* può causare malattie gravi, quali faringite, sinusite, bronchite acuta e polmonite acquisita in comunità. L'infezione non rilevata e non trattata può 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 e cresce bruscamente nei teenager, continua a crescere fino all'età adulta e rimane elevata (>50%) nella terza età. Difficoltà nella raccolta del campione e inaccessibilità del sito di infezione compromettono seriamente l'utilità di questi metodi di rilevamento diretto. Quindi, i test serologici sono usati di routine e servono come strumento non invasivo nell'identificazione di infezioni clamidiali sia distali sia croniche (3), quando i metodi diretti sono raramente efficaci (4). In aggiunta, la presenza di alcuni tipi di anticorpi può anche indicare lo stato della malattia.

L'infezione primaria da clamidia è caratterizzata da una prevalente risposta IgM entro 2 - 4 settimane e una risposta ritardata IgG e IgA entro 6 - 8 settimane. Dopo un'infezione acuta da *C.pneumoniae*, gli anticorpi IgM si perdono di solito entro 2 -6 mesi (5), i titoli di anticorpi IgG di solito decrescono lentamente, mentre gli anticorpi IgA tendono a scendere rapidamente (6). Quando si sospetta infezione è primaria da clamidia, la rilevazione di IgM è altamente diagnostica (7). Comunque, nelle infezioni croniche o ricorrenti la prevalenza di IgM è bassa e quindi l'assenza di IgM non necessariamente esclude infezioni in atto.

Nelle reinfezioni i livelli di IgG e IgA crescono rapidamente, spesso in una o due settimane(8).

Gli anticorpi IgA sono un affidabile marker immunologico di infezioni primarie, croniche e ricorrenti. Questi anticorpi scendono rapidamente a livelli base a seguito di trattamento ed eradicazione delle infezioni da clamidia (3). La persistenza di titoli anticorpali IgA è generalmente considerata come segno di infezione cronica (6).

Gli anticorpi IgG persistono per lunghi periodi e declinano molto lentamente. Quindi, la

presenza di anticorpi IgG è indicativa principalmente di un'infezione da clamidia in un tempo indeterminato. Comunque, un aumento di 4 volte delle IgG o alti livelli di anticorpi IgG possono indicare un'infezione cronica in atto.

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

Principio del Test

- Le micropiastre SeroCP™ Quant sono fornite rivestite con corpi elementari purificati di *C.pneumoniae* (TWAR-183) come antigeni.
 - Il siero da saggiare viene diluito e incubato nella piastra SeroCP™ Quant per 1h a 37°C. In questo passaggio gli anticorpi anti-*C.pneumoniae* si legano agli antigeni immobilizzati.
 - Gli anticorpi non specifici sono rimossi con il lavaggio.
 - Si aggiungono Anti-IgG umane coniugate con perossidasi di rafano (HRP) e si fa incubare per 1h a 37°C. In questo passaggio il Coniugato- HRP si lega al complesso antigene-anticorpo preformato.
 - Il coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio.
 - Si aggiunge il Substrato-TMB che viene idrolizzato dalla perossidasi, ottenendo una soluzione blu del cromogeno ridotto.
 - Su aggiunta della Soluzione d'Arresto, il colore blu vira al giallo e dovrebbe essere letto da un lettore ELISA alla lunghezza d'onda di 450/620nm.
 - L'assorbanza è proporzionale alla quantità di anticorpi specifici legati agli antigeni pre-fissati.
-

Contenuto del Kit

Test kit per 96 Determinazioni

1. **Micropiastra rivestita con antigene di *C.pneumoniae*:** 96 pozzetti separabili (8x12) rivestiti con antigeni di *C.pneumoniae*, confezionati in busta di alluminio contenente un dessiccante,

1 Piastra
2. **Soluzione di lavaggio concentrata (20X):** Un tampone PBS - Tween, (pH 7.4-7.6) contenente NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ e Tween 20.

1 Flacone, 100ml
3. **Diluente del Siero (blu):** Una soluzione tampone pronta per l'uso. Contiene meno dello 0.05% di Proclin come conservante.

1 Flacone, 60ml
4. **Diluente del Coniugato (verde):** Una soluzione tampone pronta per l'uso. Contiene meno dello 0.05% di Proclin come conservante.

1 Flacone, 40ml
5. **Controllo Negativo:** Un siero umano, pronto per l'uso, negativo per IgG contro *C.pneumoniae*. Contiene meno dello 0.1% di Sodio azide come conservante

1 Flacone, 2ml
6. **Controllo Positivo:** Un siero umano, pronto per l'uso, positivo per IgG contro *C.pneumoniae*. Contiene meno dello 0.1% di Sodio azide come conservante.

1 Flacone, 2ml
7. **P10-calibratore:** Un siero umano positivo per IgG contro *C.pneumoniae* pronto per l'uso, contiene 10 BU/ml (unità di legame arbitrarie) di IgG. Contiene meno dello 0.1% di Sodio azide e meno dello 0.05% di Proclin come conservante.

1 Flacone, 2ml
8. **P50-calibratore:** Un siero umano positivo per IgG contro *C.pneumoniae* pronto per l'uso, contiene 50 BU/ml di IgG. Contiene meno dello 0.1% di Sodio azide e meno dello 0.05% di Proclin come conservante.

1 Flacone, 2ml
9. **P100-calibratore:** Un siero umano positivo per IgG contro *C.pneumoniae* pronto per l'uso, contiene 100 BU/ml di IgG. Contiene meno dello 0.1% di Sodio azide e meno dello 0.05% di Proclin come conservante.

1 Flacone, 2ml
10. **HRP-Coniugato Concentrato (300X):** Perossidasi di rafano (HRP) coniugata con anti IgG umane (catena gamma specifiche). Contiene meno dello 0.05% di Proclin come conservante.

1 Flacone, 0.2ml
11. **TMB-Substrato:** Una soluzione pronta per l'uso. Contiene 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina come cromogeno e perossidasi come substrato.

1 Flacone, 14ml
12. **Soluzione Stop:** Una soluzione pronta per l'uso H₂SO₄ 1M.

1 Flacone, 15ml
13. **Copri Piastra:**

1 unità
14. **Istruzioni per l'Uso:**

1

Materiali richiesti ma non forniti:

1. Provette pulite per la diluizione dei sieri dei pazienti.
 2. Flacone di plastica monouso per la diluizione del coniugato-HRP concentrato.
 3. Micropipette regolabili e pipette multicanale (5-50, 50-200 e 200-1000µl) e puntali monouso.
 4. Beuta volumetrica da 1 litro.
 5. Un cilindro volumetrico da 50ml.
 6. Flacone per lavare a spruzzo.
 7. Carta assorbente.
 8. Vortex mixer
 9. Bagnomaria a 37°C con coperchio, o camera umida in un incubatore a 37°C.
 10. Lettore ELISA con filtri a 450 e 620nm.
 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. Poichè nessun metodo può offrire completa assicurazione che prodotti derivati da sangue umano non trasmettano infezioni, tutti i componenti da sangue umani forniti in questo kit devono essere maneggiati come siero o sangue potenzialmente infetto secondo le raccomandazioni pubblicate nel manuale CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988".
 2. La soluzione TMB-Substrato è irritante per la pelle e le membrane mucose. Evitare il contatto diretto.
 3. Tutti i componenti di questo kit sono stati calibrati e testati per lotto. Non è raccomandabile mescolare componenti da lotti diversi in quanto potrebbe alterare il risultato.
 4. Acido solforico diluito (H_2SO_4 1M) è un agente irritante per gli occhi e la pelle. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con acqua e consultare un medico.
-

Conservazione e stabilità dei reagenti

1. Tutti i reagenti forniti dovrebbero essere conservati a 2-8°C. I flaconi non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. L'esposizione di componenti sigillati mai aperti a temperatura ambiente per alcune ore non causerà danno ai reagenti. **NON CONGELARE !**
2. Una volta aperto il kit, la sua scadenza è di 90 giorni.
3. Le strisce non usate devono essere risigillate nella busta di alluminio con il dessiccante, arrotolando l'estremità aperta e sigillando con nastro adesivo l'intera lunghezza dell'apertura.
4. Durante la conservazione al freddo possono formarsi cristalli nel Tampone di

lavaggio concentrato 20X, ciò è perfettamente normale. Sciogliere i cristalli riscaldando il tampone a 37°C prima di diluire. Una volta diluita, la soluzione può essere conservata a 2-8°C fino a 21 giorni.

Raccolta del Siero

Preparare i sieri da campioni raccolti asetticamente usando tecniche standard. Non usare sieri inattivati al calore. L'uso di sieri lipemici, torbidi o contaminati non è raccomandato. Materiale particolato e precipitati nei sieri possono causare risultati erranei. Tali campioni dovrebbero essere chiarificati per centrifugazione o filtrazione prima del test.

Conservazione dei Campioni

Conservare i campioni a 2-8°C e analizzare entro 7 giorni (l'aggiunta di Sodio Azide allo 0.1% è fortemente raccomandata). Se ci si aspetta una conservazione più lunga, aliquotare e conservare i campioni sotto -20°C. Evitare scongelamenti e congelamenti ripetuti

Procedimento del Test - Manuale

Protocollo di automazione disponibile su richiesta

A. Preparazione dei Reagenti

1. Portare tutti i componenti e i campioni da saggiare a temperatura ambiente. Mescolare bene i calibratori (P10, P50, P100), i Controlli Negativo e Positivo e i campioni clinici prima dell'uso.
2. Determinare il numero totale dei campioni da saggiare. In aggiunta ai campioni, aggiungere in ogni test: un pozzetto di Controllo Positivo, un pozzetto di Controllo Negativo e tre pozzetti di calibratori (P10, P50, P100).
3. Estrarre la micropiastra dalla busta di alluminio tagliando un'estremità vicino alla chiusura sigillata. Lasciare le strisce necessarie (secondo il numero di campioni da saggiare) nel supporto da 96 pozzetti.
4. Diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato 1/20 con acqua distillata o bi-deionizzata. Per esempio, per preparare un litro di tampone di lavaggio, aggiungere 50ml del Tampone di Lavaggio Concentrato a 950ml di acqua distillata o bi-deionizzata.

B. Incubazione dei Campioni di siero e Controlli

5. Diluire ciascun siero dei pazienti 1:400 con il Diluente del Siero fornito usando una delle seguenti opzioni:
 - a) **Raccomandata per l'uso su un sistema automatico: (Questo metodo richiede un flacone extra di Diluente del Siero)**
 - Aggiungere 10µl di siero dei pazienti a 990µl di Diluente del Siero (1:100).
 - Dispensare 45µl di Diluente del Siero in ciascun pozzetto. Aggiungere 15µl del campione pre-diluito 1:100 a ciascun pozzetto.

- Dispensare quindi 60µl di ciascuno dei 3 calibratori (P10, P50, P100) , del Controllo Positivo e del Controllo Negativo pronti per l'uso in pozzetti separati.
- b) Raccomandata per uso manuale:**
- Aggiungere 10µl di siero dei pazienti a 190µl di Diluente del Siero (1:20).
 - Diluire ulteriormente aggiungendo 10µl della diluizione 1:20 a 190µl di Diluente del Siero.
 - Dispensare 50µl dei 3 calibratori (P10, P50, P100) del Controllo Positivo e Negativo pronti per l'uso e dei campioni diluiti 1:400 in pozzetti separati.
6. Coprire le strisce con un copripiastre e incubare per 1h a 37°C.
 7. Scartare il liquido contenuto nei pozzetti.
 8. **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.
 9. Asciugare le strisce e il portastrisce sbattendole gentilmente su carta assorbente pulita.

C. Incubazione con coniugato

10. Il coniugato–HRP concentrato anti-IgG umane deve essere diluito a soluzione di lavoro poco prima dell'uso. Diluire il coniugato–HRP concentrato anti-IgG umane 1/300 con Diluente del Coniugato.
Per esempio: per due strisce preparare un minimo di 3ml di coniugato come segue:10 ml di Coniugato–HRP concentrato anti-IgG umane viene mescolato con 3ml of Diluente del Coniugato.
11. Dispensare 50µl di coniugato diluito in ciascun pozzetto.
12. Coprire le strisce con un copripiastre e incubare per 1h at 37°C in una camera umida.
13. Scartare il liquido contenuto nei pozzetti e lavare come descritto ai punti 8-9.

D. Incubazione con il Substrato TMB

14. Dispensare 100µl di Substrato-TMB in ciascun pozzetto, coprire le strisce con un copripiastre e incubare a temperatura ambiente per **15 minuti**.
15. Arrestare la reazione aggiungendo 100µl soluzione d'arresto (H₂SO₄ 1M) a ciascun pozzetto.

E. Determinazione dei Risultati

16. Determinare l'assorbanza a 450/620nm e registrare i risultati. La determinazione deve essere fatta entro 30 minuti dall'arresto della reazione cromogena.

Nota: *Le bolle d'aria devono essere rimosse prima della lettura. Il fondo della piastra ELISA deve essere asciugato con cura.*

Validazione del Test

I seguenti criteri devono essere osservati per validare il test. Se questi criteri non sono rispettati, il test va considerato non valido e deve essere ripetuto.

1. O.D $P_{100}/P_{10} > 2.5$
 2. O.D $P_{50}/P_{10} > 1.7$
 3. Contr. Neg. dovrebbe essere < 10 BU/ml
 4. Contr. Pos. dovrebbe essere > 30 BU/ml
-

Calcolo dei Risultati

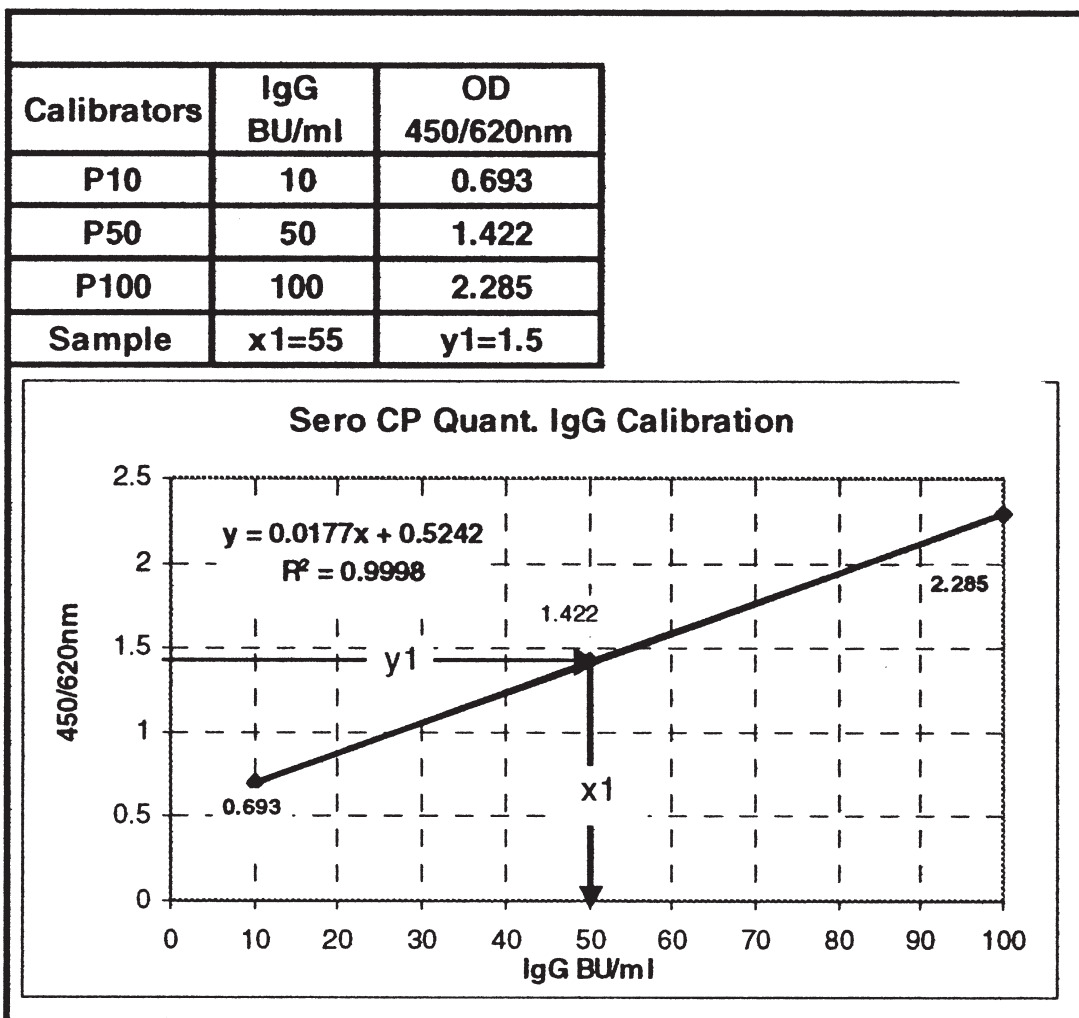
Metodo manuale, usando carta millimetrata:

1. Tracciare i valori di assorbanza (OD) dei 3 calibratori (P10, P50 e P100) sull'asse Y contro la loro concentrazione (BU/ml) sull'asse X.
2. Disegnare la miglior curva lineare tra i punti.
3. Usando la curva standard, interpolare la concentrazione dei campioni saggiati (in BU/ml) da ciascuna assorbanza misurata (vedi esempio1).

Esempio 1: Interpolazione dei risultati:

Sull'asse- Y leggere il valore di assorbanza del campione e tracciare una linea orizzontale alla curva di calibrazione.

Dall'intercetta, tracciare una linea verticale all'asse-X e interpretare la concentrazione in BU/ml del campione.



Interpretazione dei Risultati

IgG BU/ml	Risultati	Interpretazione Diagnostica
< 10 BU/ml	Negativo Anticorpi IgG non rilevabili	Nessuna indicazione di infezione da <i>C.pneumoniae</i>
≥ 10 BU/ml	Positivo Rilevanti livelli di anticorpi IgG	Indicazione di infezione corrente o Passata da <i>C.pneumoniae</i>¹.

BU=Binding Units (Unità di Legame)

¹ Per differenziare tra infezione pregressa o corrente, si raccomanda di prelevare un secondo campione dopo 2-4 settimane. Se il valore EPT del secondo campione è incrementato di 4 volte rispetto al primo campione (usare la tabella sotto riportata), è rilevata un'infezione corrente.

Correlazione dei risultati SeroCP™ Quant con i Titoli a Termine MIF (EPT) SeroFIA™ IgG

I kit SeroCP™ Quant IgG semi-quantitativi sono stati calibrati in confronto con il sistema SeroFIA™ IgG (Savyon Diagnostics Ltd., Israel) MIF. La correlazione è illustrata in Tabella No 1.

Tabella No. 1

SeroCP™ Quant IgG Range in BU/ml	SeroFIA™ IgG Titoli a Termine
< 10	Neg
10-30	64
31-50	128
51-80	256
> 80	≥ 512

Nota: Non c'è standardizzazione tra i risultati di MIF diverse. Ogni MIF può dare diverse EPT.

Caratteristiche diagnostiche

Confronto di SeroCP™ Quant IgG con SeroCP™ IgG

SeroCP™ Quant IgG è stato valutato in confronto a SeroCP™ IgG (Savyon Diagnostics Ltd. Israel, Catalogo No. 191-01)

Lo studio comprendeva 197 campioni di siero da soggetti sintomatici e 34 campioni di siero da soggetti sani.

Sono state calcolate la sensibilità e la specificità:

Sensibilità: 190/197 = 96.4%

Specificità: 33/34 = 97.0%

Reazioni Crociate

Pazienti ospedalizzati, infettati con *C. trachomatis*, *CMV* ed *EBV*, già diagnosticati con kit serologici commerciali, sono stati testati anche con SeroCP™ Quant. Non sono state rilevate reazioni crociate significative.

Limitazioni del Test

1. Nessun singolo test serologico dovrebbe essere usato per la diagnosi definitiva. Tutti i dati clinici e di laboratorio dovrebbero essere presi in considerazione..
 2. I campioni ottenuti troppo precocemente durante un'infezione primaria possono non contenere anticorpi rilevabili.
Se si sospetta infezione da *Clamydia* si dovrebbe prelevare un secondo campione dopo 2-4 settimane per saggiarlo in parallelo con il campione originale.
 3. Sostanze interferenti: l'uso di sieri lipemici, torbidi o contaminati non è raccomandabile. Materiale particolato e precipitati nel siero possono causare risultati erranei. Tali campioni dovrebbero essere chiarificati per centrifugazione o filtrazione prima del test.
-

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.

M291-01I 04-10/13



SAVYON DIAGNOSTICS Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 77610, Israel
Tel: 972.8.8562920 Fax: 972.8.8523176
e-mail: support@savyondiagnosics.com



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