



SeroELISA™ Chlamydia IgG

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

Istruzioni per l'Uso

Kit per 96 determinazioni
(Catalogo No. 111-01)

Per Uso Diagnostico In Vitro
Solo per uso professionale
Conservare a 2-8°C. **Non Congelare**

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL

Tel: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Applicazioni

Il kit SeroELISA™ Chlamydia IgG è inteso per la determinazione di anticorpi IgG specifici per Chlamydia in un singolo campione di siero umano o per valutare coppie di sieri, con un Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Per Uso Diagnostico In Vitro.

Introduzione

Chlamydia è un batterio gram-negativo obbligato intracellulare che causa malattie acute e croniche in specie di mammiferi e uccelli. Il genere Chlamydia comprende quattro specie: *C.trachomatis*, *C.pneumoniae*, *C.psittaci* e *C. pecorum*.

C.trachomatis si divide in 15 serovar (1). I serovar A, B, Ba e C sono agenti dei tracoma (2), la causa principale di cecità endemica prevenibile nel terzo mondo. I serovar L₁-L₃ sono gli agenti del linfogranuloma venereo. I serovar D-K sono causa comune in tutto il mondo di infezioni genitali sessualmente trasmesse: cervicite, endometrite/salpingite (3) nelle femmine e uretrite (4) in maschi e femmine. L' endometrite/salpingite può portare a occlusione tubarica con aumentato rischio di gravidanza extrauterina e infertilità. L'infezione genitale può causare occasionalmente un'infezione acuta e persistente senza sintomi clinici. Generalmente, queste infezioni sono trattabili una volta diagnosticate. Comunque, senza trattamento l'infezione può progredire a infiammazione cronica grave e portare a infertilità, gravidanza ectopica, aborto indotto o parto prematuro. Inoltre, I neonati di

madri infette possono infettarsi durante il parto e contrarre congiuntiviti o polmonite (5).

C.pneumoniae è un importante patogeno respiratorio nell'uomo e causa fino al 10% dei casi di polmonite acquisita in comunità. E' stato associato con malattie respiratorie acute, polmonite, asma, bronchite, faringite, sindrome toracica acuta, malattia coronaria e sindrome di Guillain-Barre (6).

C.psittaci infetta una diversa gamma di specie ospiti dai molluschi agli uccelli ai mammiferi e causa anche gravi polmoniti.

I test serodiagnostici, che si basano su specifici marker immunologici, servono da strumenti diagnostici non invasivi nell'identificazione delle infezioni sia distali sia profonde (7). Si è trovato che elevati titoli di anticorpi IgG anti-Chlamydia sono indicativi di infezione clamidiale attiva. (3, 8).

Alti livelli di anticorpi IgG anti-Chlamydia hanno valore diagnostico nelle infezioni sistemiche o croniche quali salpingite, infertilità meccanica, periepatite, epididimite, sindrome di Reiter e polmonite (3, 9, 10).

Savyon Diagnostics ha sviluppato un enzyme-linked immunosorbent assay per la determinazione di anticorpi IgG specifici per Chlamydia.

SeroELISA™ Chlamydia impiega l'antigene ad ampia reattività del serovar L₂ di *C. trachomatis* che rileva anticorpi per *C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae* (TWAR).

Principio del Test

- Il siero umano da saggiare è messo in contatto con il materiale antigenico che riveste i micropozzetti. Gli anticorpi specifici, se presenti nel siero del paziente si legheranno agli antigeni immobilizzati formando un complesso antigene-anticorpo. Se il siero in esame non contiene anticorpi per questo particolare antigene, non si forma alcun complesso e tutte le componenti seriche vengono lavate via nella fase di lavaggio.
- Anti-IgG umane (catena γ specifiche) coniugate con perossidasi di rafano (HRP) vengono aggiunte nel pozzetto. Se un complesso antigene-anticorpo si è formato nel passaggio precedente, l'anticorpo coniugato con perossidasi si legherà alla metà anticorpale del complesso. Se nel passaggio precedente non si era formato alcun complesso, il coniugato viene lavato via nella fase di lavaggio.
- Si aggiunge il substrato. Una reazione positiva è indicata da un colore da blu a blu intenso che si sviluppa nei pozzetti a seguito della reazione enzimatica della perossidasi con perossido e con il reagente cromogeno. Dopo che la reazione enzimatica viene fermata da una soluzione acida si determina l'assorbanza dei pozzetti a 450nm con uno spettrofotometro.
- L'assorbanza a 450nm è indicativa del titolo di IgG anti-Chlamydia nei campioni di siero dei pazienti.

Procedimento del test

1. Antigene Chlamydia + Siero positivo per
fissato alla fase IgG Anti-Chlamydia
solida (Ag) (Ab₁)

↓
Complesso AgAb₁

2. Complesso AgAb₁ + Anti- IgG umane
coniugate con HRP
(Ab₂)

↓
Complesso AgAb₁Ab₂

3. Complesso + Substrato-TMB
AgAb₁Ab₂

↓
Soluzione blu

↓ ← Soluzione
d'arresto
Soluzione gialla
(Determinazione assorbanza a 450nm)

Avvertenze e Precauzioni

- **Avvertenza:** IL MATERIALE ANTIGENICO CLAMIDIALE E' STATO INATTIVATO E NON CONTIENE ORGANISMI VIVENTI RILEVABILI. COMUNQUE, LE STRISCE DOVREBBERO ESSERE MANIPOLATE ED ELIMINATE COME OGNI MATERIALE DI LABORATORIO A RISCHIO BIOLOGICO.
- **Precauzioni:** Questo kit contiene siero umano che è stato testato con metodiche approvate dall'FDA, 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.
- **Per Uso Diagnostico *In-vitro*.**

Contenuto del kit

1. Micropiastra pre-rivestita (96 pozzetti). Ogni busta contiene una piastra costituita da 12 strisce rimovibili su una cornice di plastica. Ogni striscia è rivestita con antigeni di Chlamydia.
1 Unità
2. Controllo Positivo (siero umano positivo per anticorpi IgG anti-Chlamydia). Pronto per l'uso.
1 flacone, 2.0ml
3. Controllo Positivo Basso (siero umano positivo basso per anticorpi IgG anti-Chlamydia). Pronto per l'uso.
1 flacone, 2.0ml

4. Controllo Negativo (siero umano negativo per anticorpi IgG anti-Chlamydia). Pronto per l'uso.
1 flacone, 2.0ml
5. Anti-IgG Umane (catena-γ specifiche) coniugate con HRP. Pronto per l'uso.
1 flacone, 10ml
6. Diluente del siero, Pronto per l'uso.
2 flacone, 60ml
7. Tampone di lavaggio concentrato (x20).
1 flacone, 100ml
8. Substrato TMB, Pronto per l'uso.
1 flacone, 16ml
9. Soluzione d'arresto (H₂SO₄ 1M), Pronto per l'uso.
1 flacone, 16ml
10. Copripietra.
1 Unità
11. Istruzioni per l'uso.
1

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

1. Provette pulite per la diluizione dei sieri dei pazienti .
2. Micropipette regolabili, o multicanale (5-50, 50-200 e 200-1000µl) e puntali monouso.
3. Pipette di plastica monouso (varie misure) e attrezzatura per pipettaggio in sicurezza.
4. Beuta volumetrica da 1 litro.
5. Un cilindro volumetrico da 50ml.
6. Lavatore per piastre ELISA o bottiglia per lavaggi.
7. Asciugamani di carta o carta assorbente.
8. Vortex mixer.
9. Bagnomaria a 37°C con coperchio, o camera umida in incubatore a 37° ± 1°C.
10. Lettore-ELISA con filtro a 450nm.
11. Acqua distillata o bi-deionizzata per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.

Conservazione e Stabilità dei Reagenti

Tutti i materiali forniti devono essere conservati a 2° - 8°C. Se conservati a 2° - 8°C I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla scatola. L'esposizione di flaconi ancora sigillati a temperatura ambiente per alcune ore non causa danno ai reagenti stessi. **NON CONGELARE!** Quando un kit è in uso, la scadenza del materiale è di 60 giorni dalla prima apertura del flacone. Una volta aperto, il sacchetto di alluminio contenente le strisce dovrebbe essere sigillato con nastro adesivo. Il materiale disidratante non deve essere rimosso.

Raccolta dei Campioni

I campioni di siero dovrebbero essere raccolti asepticamente e conservati a 2° - 8°C con 0.05% sodium azide (NaN₃) come conservante se devono essere testati entro pochi giorni. Per periodi più lunghi, aliquote dei campioni di siero dovrebbero essere conservate a -20°C. Poiché campioni di siero torbido o emolitico possono dare risultati meno riproducibili, si raccomanda vivamente che i campioni di siero da saggiare siano limpidi e non emolitici

Procedura del Test

Note:

- a) Le componenti di questo kit sono state testate come singola unità. Non mescolare componenti da lotti diversi o da kit di altro produttore.
- b) Tutti i reagenti devono essere a temperatura ambiente prima dell'uso. Diluente del Siero e Diluente del Coniugato gelificano quando refrigerati. Se necessario, accelerare la liquefazione riscaldando queste componenti a 37°C per alcuni minuti.
Cristalli di sale possono formarsi nel tampone di Lavaggio Concentrato conservato a 2°- 8°C. Questi cristalli dovrebbero essere completamente ridisciolti riscaldando a 37°C prima della diluizione.
- c) Non eseguire il test in presenza di vapori reattivi (p.es. da acidi, alcali o aldeidi) o polveri, in quanto possono influenzare l'attività enzimatica del coniugato Anti-IgG Umane-HRP
- d) Non toccare la cima delle strisce. Non toccare i bordi dei pozzetti con la punta delle pipette dispensando i reagenti.
- e) Usare puntali monouso. Evitare contaminazione crociata tra reagenti.
- f) Battere leggermente il flacone su una superficie rigida per liberare il liquido che potrebbe essere intrappolato sul tappo.
- g) Evitare la formazione di bolle d'aria nei pozzetti.
- h) Dispensare i liquidi lentamente per evitare vaporizzazione.
- i) Controllo Positivo, Controllo Positivo Basso e Controllo Negativo dovrebbero essere testati assieme ai campioni di siero ogni volta che si esegue il test
- j) Un pozzetto dovrebbe essere usato per il bianco ogni volta che si esegue il test.
- k) Tutti i passaggi dovrebbero essere eseguiti sequenzialmente senza interruzione.

Procedimento del Test – Manuale

Protocollo di automazione disponibile su richiesta

A) Lavaggio delle strisce

Prelavare le strisce è consigliabile ma non obbligatorio. In ogni caso, le strisce dovrebbero essere bagnate da tampone di Lavaggio prima dell'applicazione dei campioni e asciugate sbattendole su carta assorbente pulita prima del test. Se non si impiega un lavatore automatico ELISA procedere come segue:

1. Rimuovere le strisce necessarie dal sacchetto di alluminio e inserirle sulla cornice portastrisce.
2. Diluire il Tampone di Lavaggio Concentrato 1:20 con acqua distillata.
Per Esempio: Per una striscia preparare 100ml di Tampone di Lavaggio (5ml di Tampone di Lavaggio Concentrato con 95ml di acqua distillata). Mescolare delicatamente per 20 minuti.
La Soluzione di Lavaggio dovrebbe essere preparata prima dell'uso e quella in eccesso eliminata.

3. Dopo l'incubazione riempire ciascun pozzetto con Tampone di Lavaggio fino a metà pozzetto.
4. Attendere 2 minuti e poi svuotare la striscia. Ripetere questi passaggi **cinque** volte.
5. Asciugare la cima delle strisce e la cornice sbattendole delicatamente su carta assorbente pulita. *Un completo lavaggio dei pozzetti dopo l'incubazione è essenziale per risultati ottimali. Non lasciare tracce di Tampone di Lavaggio nei pozzetti.*

B) Incubazione dei Campioni di Siero e dei Controlli

6. Diluire ogni siero di paziente 1:256 con Diluente del Siero come segue:

1:16 - Aggiungere 10µl di siero del paziente a 150µl di Diluente del Siero

1:256 - Aggiungere 10µl della diluizione 1:16 a 150µl di Diluente del Siero

I **Controlli** sono forniti pronti per l'uso e non devono essere diluiti.

7. Pipettare 50µl di Controllo Positivo, Controllo Positivo Basso, Controllo negativo pronti per l'uso e diluizioni 1:256 del siero dei pazienti in pozzetti separati.
Pipettare 50µl di Diluente del Siero in un pozzetto per il bianco.
Il pipettaggio dei campioni di siero e dei controlli nei pozzetti dovrebbe essere eseguito entro 10 minuti.
8. Coprire le strisce con un copripietra e incubare per 30 minuti a 37°C in camera umida.
9. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti. Lavare i pozzetti **cinque** volte e asciugare come ai punti A) 3-5.

C) Incubazione con Coniugato

10. Pipettare 50µl of HRP *Coniugato Anti-IgG Umane-HRP diluito* in ogni pozzetto.
11. Coprire le strisce con un copripietra e incubare per 30 minuti a 37°C in camera umida.
12. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti, lavarli **cinque** volte e asciugarli come ai punti A) 3-5.

D) Incubazione con Substrato-TMB

13. Pipettare 100µl di Substrato-TMB in ogni pozzetto.
14. Coprire le strisce con un copripietra e incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.
15. Arrestare la reazione aggiungendo 100µl di Soluzione d'Arresto in ogni.
Pipettare la Soluzione d'Arresto nella stessa sequenza e agli stessi intervalli di tempo del Substrato-TMB al punto D14.
16. Calibrare lo spettrofotometro sul pozzetto del bianco. Determinare l'assorbanza a 450nm e registrare i risultati.
E' consigliabile l'immediata lettura dell'assorbanza (anche se non indispensabile). La determinazione dell'assorbanza non dovrebbe superare i 30 minuti, dopo l'arresto della reazione cromogena.

Accettabilità del Test

Un test è valido se:

- Assorbanza del Controllo Positivo ≥ 0.8 a 450nm
- Assorbanza del Controllo Positivo Basso ≥ 0.4 a 450nm
- Assorbanza del Controllo Negativo ≤ 0.15 a 450nm

Se queste condizioni non sono soddisfatte, il test non è valido e dovrebbe essere ripetuto.

Calcolo del Valore di Cut-Off (COV)

Il cut-off è calcolato secondo la seguente formula:

$$COV = 0.154 \times (Pc - Nc) + Nc$$

Pc = Assorbanza del Controllo Positivo a 450nm

Nc = Assorbanza del Controllo Negativo a 450nm

Interpretazione dei Risultati

Absorbanza a 450nm	Interpretazione e dei Risultati	Titolo IgG Chlamydia Stimato
Sotto COV - 0.03	Negativo	<256
COV \pm 0.03	Equivoco*	256
Sopra COV +0.03 fino al Controllo Positivo Basso	Positivo Basso	256-512
Sopra Controllo Positivo Basso I fino a Controllo Positivo	Positivo	1024-2048
Above Positive Control	Positivo Alto	≥ 2048

* Ritestare i campioni di siero classificati equivoci. Se si ripete il risultato equivoco si raccomanda di ripetere il test su prelievi successivi.

Significato dei Risultati

L'esperienza clinica e studi recenti indicano che elevati livelli di anticorpi IgG contro Chlamydia possono servire come marker per infezione da Chlamydia attiva o cronica.

Determinazione di Titoli a Termine

Per monitorare il profilo immune di un paziente, si dovrebbero confrontare campioni di siero in fase acuta e convalescenza. La titolazione a termine di coppie di siero dovrebbe essere eseguita con entrambi i campioni di siero nella stessa serie di test. La diluizione del siero più elevata con assorbanza sopra il cut-off è il **titolo a termine**.

Limitazioni del Test

- Nessun singolo test serologico dovrebbe essere usato come unico criterio per la diagnosi. Tutti i dati clinici e di laboratorio dovrebbero essere considerati.
- Il test è un ELISA su singolo serovar (L₂). L₂ contiene determinanti antigenici esistenti in serovar di *Chlamydia trachomatis* come pure antigeni di gruppo. Anticorpi contro *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) e *Acinetobacter calcoaceticus* possono anche essere rilevati con questo ELISA.
- Il significato dei titoli dei campioni devono essere valutati in relazione alle caratteristiche della popolazione in esame. Queste caratteristiche devono includere, tra l'altro, età, locazione geografica e comportamento sessuale.
- Questo test non indica il sito di infezione da chlamydia e non intende sostituire l'isolamento in coltura cellulare, se disponibile.
- L'assenza di anticorpi misurabili nel siero non esclude la possibilità di infezione da clamidia.
- Il siero contaminato da batteri o iperlipemico può dare risultati erranei.

Prestazioni Caratteristiche

SeroELISA™ Chlamydia è stato confrontato con IPAzyme™ Chlamydia IgG/IgA test (Savyon Diagnostics product, Cat. No. 011-01) che è un test serologico accettato per la determinazione di anticorpi IgG contro Chlamydia.

La popolazione studiata includeva pazienti con sospetta infezione da Chlamydia come pure individui sani (n=328). I risultati sono riassunti come segue:

Confronto tra SeroELISA™ ed IPAzyme™

SeroELISA™ \ IPAzyme™	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	116	8	124
Negativo	10	194	204
Totale	126	202	328

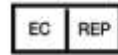
Accordo globale: $(310/328) \times 100 = 94.5\%$

Reattività Crociata

Pazienti ospedalizzati, infettati con patogeni del: *Neisseria gonorrhoea*, *Staphylococcus aureus* ed *Peptostreptococcus anaerobius* diagnosticati con kit serologici commerciali, sono stati testati anche con il kit SeroELISA Chlamydia. Dei sieri è risultata negativa, non si è rilevata alcuna cross-reattività significativa.

Bibliografia

1. **Yuan, Y., Zhang, Y. X., Watkins, N. G. and Caldwell, H.D.** (1989). Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. *Infection and Immunity*. **57**:1040-1049. Copyright 1989, American Society for Microbiology.
2. **Trehanne J. D.** (1985). The community epidemiology of trachoma. *Rev Infect Dis*. **7**:760-763.
3. **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.
4. **Wang, S.P., Grayston, J.T., Kuo, C.C., Alexander, E.R., and Holmes, K.K.** (1977). SeroDiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the microimmunofluorescence test. In: Nongonococcal urethritis and related infection, D. Hobson and K.K. Holmes (Eds), P. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 237-248.
5. **Thompson III S. E., and Dretler R. H.** (1982). Epidemiology and Treatment of Chlamydial Infections in Pregnant Women and Infants. *Review of Infectious Diseases* **4**:S747
6. **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.
7. **Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini R., Holcber, G., Potashnik, G. Sarov, B. and Insler, V.** (1986). Specific IgG and IgA Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in Infertile Women. *Int. J. Fertil* **31**:193-197.
8. **Csango, P.A., Sarov, B., Schiotz, H., Sarov, I.** (1988) Comparison Between Cell Culture and Serology for Detecting *Chlamydia trachomatis* in women seeking abortion. *J. Clin. Pathol*. **41**:89-92.
9. **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**:130-137.
10. **Kletter, Y., Caspi, D., Yarom, M., Sarov, B., Sarov, I. And Tanay, A.** (1988) Serum IgA and IgG Antibodies Specific to *Chlamydia* in Patient's with Reiter's Syndrome (RS). In: Proceedings of the European Society for *Chlamydia* Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna. p. 170.



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