



Chlamydia IgM SeroFIA™

Test in Immunofluorescenza per la determinazione di anticorpi IgM 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. 512-01

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

Applicazioni

Chlamydia IgM SeroFIA™ è un test semiquantitativo in immuno-fluorescenza per la determinazione differenziale di IgM 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 aplotipo 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 90 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-IgG 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.

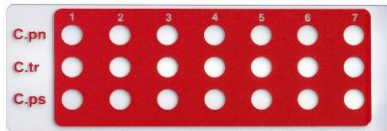
- Determinazioni qualitative si ottengono con un'unica diluizione del siero. Risultati semi-quantitativi si raggiungono con titolazioni a termine.

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 IgM 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 IgM 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 IgM contro *C.psittaci*. Contiene sodio azide <0.1%. Pronto per l'uso.

1 flacone, 0,2ml

8. Reagente di Inattivazione delle IgG: anti-IgG umane contiene meno dello 0,1% di sodio azide

1 flacone, 4ml

9. Coniugato-FITC: anticorpi di coniglio fluoresceinati (catena μ -spezifici) anti-IgM umane. Pronto per l'uso.

1 flacone, 3,3ml

10. Fluido di montaggio:

contiene sodio azide <0.1%

1 flacone contagocce, 1,5ml

11. Coprioggetti: 1 x 15 Unità

12. 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 asetticamente 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

1. Aggiungere 5µl di ciascun siero dei pazienti a 45µl di Reagente di Inattivazione delle IgG. Mescolare sul Vortex con attenzione.
2. A ogni 50µl di siero come sopra trattato aggiungere 50µl di Diluente del Siero. La diluizione finale del siero ottenuta in questo passaggio è 1:20.

Per determinare i titoli a termine diluire serialmente i sieri in Diluente del Siero partendo da 1:20

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 1:64.

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 90 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 1:20			Interpretazione
C.pn	C.tr	C.ps	

+	-	-	Presenza di anticorpi IgG specifici rispettivamente per C.pn, C.tr o C.ps. Titoli $\geq 1:20$ sono considerati evidenza presunta di infezione.
-	+	-	
-	-	+	

+	+	-	Presenza di anticorpi IgM anti-Clamidia. Può rappresentare infezioni multiple o cross-reattività inter-specie dovute a determinanti genere specifici.
-	+	+	
+	-	+	
+	+	+	

-	-	-	Negativo. Anticorpi IgM per C.pn, Ctr, C.ps non rilevabili
---	---	---	--

Significato dei Titoli a Termine

Se si richiedono risultati semi-quantitativi si dovrebbe eseguire la titolazione a termine.

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 IgM SeroFIA™ in confronto ad un metodo MIF di riferimento

	MIF	Positivo	Negativo	Totale
SeroFIA™				
Positivo		4	0	4
Negativo		1	26	27
Totale		5	26	31

Sensibilità: $4/5 \times 100 = 80\%$
 Specificità: $26/26 \times 100 = 100\%$
 Concordanza: $30/31 \times 100 = 96.8\%$

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

	MIF	Positivo	Negativo	Totale
SeroFIA™				
Positivo		18	4	22
Negativo		1	123	124
Totale		19	127	146

Sensibilità: $18/19 \times 100 = 94.7\%$
 Specificità: $123/127 \times 100 = 96.8\%$
 Concordanza: $141/146 \times 100 = 96.6\%$

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

	MIF	Positivo	Negativo	Totale
SeroFIA™				
Positivo		3	2	5
Negativo		0	26	26
Totale		3	28	31

Sensibilità: $3/3 \times 100 = 100\%$
 Specificità: $26/28 \times 100 = 93\%$
 Concordanza: $29/31 \times 100 = 94\%$

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 epididymits. 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 pneumonitis 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.



European Authorized Representative: Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Tel: +(32) 2. 732.59.54
Fax: +(32) 2.732.60.03
E-Mail : mail@obelis.net