

RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM

REF KGM3101



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. Questo test RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione degli anticorpi IgG o IgM contro tutte le specie di Chlamydia (C.) nel siero umano.

I test devono essere utilizzati a scopo di conferma quando vi è un caso sospetto di infezione da Chlamydia o per chiarire lo stato immunitario.

2. Sintesi e spiegazione del test

Il gruppo della clamidia include tre agenti patogeni umani: Chlamydia trachomatis, Chlamydophila psittaci e Chlamydophila pneumoniae.

Chlamydia trachomatis è il patogeno batterico più frequentemente trasmesso per via sessuale ed è spesso causa di uretrite, cervicite o salpingite. I neonati di madri infette possono sviluppare congiuntivite o polmonite. Alcuni sierotipi danno origine al linfogranuloma venereo. La congiuntivite tracomatosa trasmessa mediante infezione da contatto è causata da altri sierotipi.

Fino a qualche anno fa, si pensava generalmente che Chlamydia pneumoniae fosse una sottospecie di Chlamydia psittaci. L'esistenza di questa terza specie di Chlamydia è stata stabilita nel 1989. Indagini più recenti hanno portato alla nascita del genere separato, Chlamydophila. A seconda dei fattori specifici dell'ospite, la Chlamydophila pneumoniae può dare origine a malattie acute dell'apparato respiratorio superiore, dei bronchi e dei polmoni. I risultati sperimentali suggeriscono che Chlamydophila pneumoniae svolga un ruolo nell'asma, nelle malattie polmonari e in altri disturbi cronici. Chlamydophila psittaci è un agente patogeno molto comune negli uccelli e nei mammiferi. Nell'uomo, colpisce solo raramente e provoca generalmente disturbi respiratori.

Per la diagnosi di infezione da clamidia è necessario un test tissutale (tampone) o la determinazione anticorpale sierica. La determinazione anticorpale si usa preferibilmente quando l'arricchimento dell'antigene è difficile o dove le quantità di antigeni esistenti non sono rilevabili. Utilizzando antigeni LPS (LPS = lipopolisaccaride) specifici per clamidia, vengono rilevati simultaneamente gli anticorpi contro tutte e tre le specie.

3. Principio del test

Un rivestimento di LPS purificati viene applicato a una piastra da microtitolazione. Gli anticorpi presenti nei campioni dei pazienti si legano agli antigeni e vengono determinati durante la seconda fase di incubazione utilizzando anticorpi anti-umani marcati con l'enzima (il coniugato). L'enzima converte il substrato incolore (H₂O₂/TMB) in un prodotto finale blu. La reazione enzimatica viene interrotta aggiungendo acido solforico e il colore della miscela passa contemporaneamente da blu a giallo. La misurazione finale viene eseguita a 450 nm su un fotometro usando la lunghezza d'onda di riferimento di 620 nm.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni)

			KGM3101 IgG/IgM
Plate	96 ril.	Piastra da microtitolazione; 12 strisce di micropozzetti (separabili) in telaio di fissaggio; rivestimento con antigene LPS di Chlamydia	X
Diluent	25 ml	Tampone del campione, pronto per l'uso; tamponato con fosfato di colore blu; contiene stabilizzanti proteici, Neolone e Bronidox	X
Wash	50 ml	Tampone di lavaggio, (concentrato 20 x); tampone fosfato, contiene Tween 20 e Proclin	X
Control IgG +	500 µl	Controllo positivo IgG, siero umano; contiene Neolone e Bronidox	X
Control IgM +	500 µl	Controllo positivo IgM, siero umano; contiene Neolone e Bronidox	X
Control IgG -	500 µl	Controllo negativo IgG, siero umano; contiene Neolone e Bronidox	X
Control IgM -	500 µl	Controllo negativo IgM, siero umano; contiene Neolone e Bronidox	X
Cut off IgG	500 µl	Controllo di cut-off IgG, siero umano; contiene Neolone e Bronidox	X
Cut off IgM	500 µl	Controllo di cut-off IgM, siero umano; contiene Neolone e Bronidox	X
Coniugate IgG	15 ml	Coniugato di IgG anti-umane, pronto per l'uso; anticorpi coniugati con perossidasi in soluzione tampone di colore arancione, contiene Neolone e Bronidox	X
Coniugate IgM	15 ml	Coniugato di IgM anti-umane, pronto per l'uso; anticorpi coniugati con perossidasi in soluzione tampone di colore arancione, contiene Neolone e Bronidox	X
Substrato	15 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto per l'uso	X
Stop	15 ml	Reagente bloccante acido solforico 0,5 M; pronto per l'uso	X

5. Istruzioni di conservazione

- Il kit del test deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C e può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.
- Il tampone di lavaggio diluito può essere usato per un massimo di 4 settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

- Per tutti gli altri reagenti, la data di scadenza indicata sull'imballaggio vale per la conservazione a 2 - 8 °C
- Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- La busta in alluminio contenente la piastra da microtitolazione deve essere aperta in modo tale da non strappare la chiusura a clip. Le strisce di micropozzetti inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.
- Inoltre i reagenti non devono essere contaminati e il substrato incolore deve essere protetto dall'esposizione alla luce diretta.

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1. Reagenti

- Acqua distillata o deionizzata
- **Vircell ELISA SORBENT (Ref. Vircell S001)** (vedere la Sezione 9.3.)

6.2. Accessori

- Incubatore o camera umida a 37 °C
- Provette
- Vorticolatore
- Micropipette con volume da 10-100 µl e 100-1000 µl
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per micropiastre o pipetta multicanale
- Lettore di micropiastre (450 nm, lunghezza d'onda di riferimento 620 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%

7. Avvertenze e misure precauzionali

Esclusivamente per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici e attenersi rigorosamente alle istruzioni per eseguire il test.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti ed evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavarsi le mani dopo aver terminato il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni o con i reagenti del test.

Per ulteriori dettagli consultare le schede dati di sicurezza (SDS) su www.r-biopharm.com.

I sieri di controllo presenti nel kit (controllo positivo, controllo negativo e controllo di cut-off) sono stati testati per HIV-Ab, HCV-Ab come pure HbsAg con risultati negativi. Tuttavia, devono essere trattati come potenzialmente infettivi analogamente ai

campioni dei pazienti e a tutti gli altri materiali con cui vengono a contatto e devono essere maneggiati secondo le disposizioni di sicurezza nazionali vigenti.

Il perossido di idrogeno (substrato) può causare ustioni. Maneggiare con cautela. In caso di contatto del reagente bloccante con la cute sciacquare con acqua.

Il reagente bloccante contiene 0,5 M di acido solforico. Evitare il contatto con la cute e con gli indumenti. In caso di contatto del reagente bloccante con la cute sciacquare con acqua.

Tutti i reagenti e materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con adeguato disinfettante o sterilizzati in autoclave per almeno 1 ora a 121 °C.

Avvertenze: Per evitare la formazione di gas velenosi, i residui liquidi contenenti reagente bloccante devono essere neutralizzati prima di essere aggiunti a una soluzione di ipoclorito.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Il test è stato sviluppato per testare campioni di siero umano. Dopo il prelievo di sangue, questo deve essere separato il prima possibile dai coaguli per evitare l'emolisi. I campioni devono essere conservati refrigerati o congelati fino al momento di eseguire il test. Evitare in ogni modo il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni e la contaminazione microbica. L'uso di campioni inattivati dal calore, lipemici, emolitici, itterici o torbidi può causare risultati errati.

Tab. 2: Conservazione del campione

Siero non diluito o plasma	
2 - 8 °C	-20 °C
1 settimana	>1 settimana

9. Esecuzione del test

9.1 Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce di micropozzetti devono essere estratte dalla busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente.

Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, il kit deve essere immediatamente riportato alla temperatura di conservazione di 2-8 °C.

Prendere solo il volume di reagenti necessario per la procedura del test. Non rimettere i reagenti nei flaconcini perché potrebbe verificarsi una contaminazione.

Le strisce di micropozzetti non possono essere utilizzate più di una volta. I reagenti e le strisce di micropozzetti non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o se i flaconcini non sono ermetici.

Il tampone di lavaggio, il tampone del campione, il substrato e il reagente bloccante non sono specifici del test; possono anche essere usati per altri dosaggi RIDASCREEN® ELISA per la determinazione di anticorpi contro Chlamydia.

9.2 Preparazione del tampone di lavaggio

1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **Wash** viene miscelata con 19 parti di acqua distillata. Per compiere questa operazione, versare 50 ml di concentrato in un cilindro graduato da 1000 ml e aggiungere acqua distillata fino a ottenere 1000 ml. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati in un bagnomaria a +37 °C per scioglierli. Il tampone di lavaggio diluito può essere utilizzato per un massimo di 4 settimane purché conservato a 2 - 8 °C.

9.3 Preparazione dei campioni

Diluire i campioni di siero e i controlli con il tampone del campione **Diluent** 1:21 prima di iniziare il test. Effettuare la diluizione direttamente sulla piastra da microtitolazione. Il controllo di cut-off deve essere determinato in duplicato. Devono essere utilizzati i controlli che corrispondono alla determinazione (IgG o IgM).

- A1 Controllo negativo
- B1 Controllo di cut off
- C1 Controllo di cut off
- D1 Controllo positivo
- E1, F1 Campione del paziente 1, 2, ecc.

Dopo aver inserito un numero sufficiente di cavità per i controlli e i campioni nel telaio di fissaggio, pipettare 100 µl di tampone del campione in ciascuno dei micropozzetti della piastra per la determinazione delle IgG e quindi aggiungere 5 µl di campione o di controllo. La piastra dovrebbe essere fatta vibrare brevemente per la miscelazione:

IgG:

campione e controlli -> 100 µl **Diluent** + 5 µl campione o controllo

Per le determinazioni di IgM, i campioni nella piastra devono essere sottoposti ad assorbimento di IgG (ad esempio con **Vircell ELISA SORBENT (Ref. Vircell S001)**) e solo successivamente regolati con il tampone del campione alla diluizione richiesta nel test. Quando si utilizza **Vircell ELISA SORBENT**, procedere come segue:

IgM:

controlli -> 100 µl **Diluent** + 5 µl controllo

campione -> 25 µl **Vircell ELISA SORBENT** + 5 µl campione: +

75 µl **Diluent**

Nota: I controlli non devono essere assorbiti.

9.4 Prima incubazione

Mettere la piastra per 45 minuti a 37 °C in un incubatore o in una camera umida. Durante questo processo, il fondo dei pozzetti non deve essere a contatto con materiali termococonduttivi (come metalli o carta umida). La piastra da microtitolazione deve essere coperta durante l'incubazione.

Nota: La piastra da microtitolazione non deve essere collocata in un contenitore di incubazione freddo che raggiunga i 37 °C durante l'incubazione. La temperatura del contenitore deve essere preventivamente regolata a 37 °C.

9.5. Lavaggio

I pozzetti devono essere svuotati in un contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Quindi, picchiettare la piastra su carta assorbente per eliminare l'umidità residua. In seguito, lavare la piastra 5 volte utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio diluito. Dopo ciascun lavaggio, assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati picchiettandoli per svuotarli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Quando si utilizza un dispositivo di lavaggio per micropiastre, accertarsi che la macchina sia regolata correttamente sul tipo di piastra impiegato. Dopo il lavaggio, picchiettare la piastra su un foglio di carta assorbente pulito per eliminare l'eventuale umidità residua.

9.6 Seconda incubazione

Aggiungere 100 µl di coniugato **Conjugate IgG**, o **Conjugate IgM** in ciascuno dei pozzetti corrispondenti. Quindi, coprire la piastra e incubarla a 37 °C per 30 minuti (vedere Sezione 9.4).

9.7. Lavaggio

Lavare 5 volte in conformità con la Sezione 9.5.

9.8 Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **Substrate** a ogni pozzetto. Quindi, coprire la piastra e incubare a temperatura ambiente per 20 minuti, al riparo dalla luce. Arrestare quindi la reazione aggiungendo 50 µl di reagente bloccante **Stop** a ogni pozzetto. Dopo avere miscelato con attenzione (picchiettando leggermente il lato della piastra) misurare l'assorbanza a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620 nm) in un fotometro per piastre. Calibrare lo zero in aria. La misurazione deve essere eseguita entro un'ora dall'aggiunta del reagente bloccante.

Nota: Quando si utilizza una camera umida, la parte inferiore della piastra da microtitolazione deve essere strofinata per rimuovere l'acqua di condensa prima di eseguire la misurazione.

10. Controllo qualità – indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

Ai fini del controllo qualità, i controlli positivo, negativo e di cut-off devono essere usati ogni volta che viene eseguito il test. Il controllo di cut-off viene determinato in duplicato e il valore medio viene calcolato dalle due singole misurazioni. Il test è stato eseguito correttamente quando i valori di estinzione (O.D.) soddisfano i seguenti criteri:

Tab. 3: Criteri controllo qualità

	OD
Controllo negativo	<0,5
Controllo di cut-off	>0,55 <1,5
Controllo positivo	>0,9

Se i valori differiscono da quelli richiesti, se il reagente è torbido o il substrato è diventato blu prima dell'aggiunta ai pozzetti, questo può indicare che i reagenti sono scaduti. Se i valori fissati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (p. es. calibrazione)
- Correttezza della procedura di esecuzione del test
- Controllo visivo dei componenti del kit per verificare che non presentino contaminazione o perdite; una soluzione di substrato che sia diventata blu non deve essere utilizzata.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

11.1 Calcolo dell'indice del campione

1. Si calcola l'assorbanza media per il controllo di cut-off.
2. L'indice del campione si ottiene dividendo l'assorbanza del campione per il valore medio calcolato.

Per esempio: OD del controllo di cut-off 1 = 0,821
OD del controllo di cut-off 2 = 0,865
Valore medio = 0,843
OD dei campioni = 1,508

$$\text{Campione indice} = \frac{1,508}{0,843} = 1,789$$

11.2 Interpretazione dei risultati

Tab. 4: Analisi dell'indice del campione

	negativo	dubbio	positivo
Indice del campione	<0,9	0,9-1,1	>1,1

12. Limiti del metodo

Il test ELISA RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM rileva anticorpi IgG o IgM contro tutte e tre le specie di Chlamydia patogena umana. Il test non può essere utilizzato per derivare una relazione tra l'estinzione determinata e l'insorgenza di sintomi clinici gravi. Il test non è adatto per localizzare il sito di infezione. I risultati ottenuti devono essere sempre interpretati in combinazione con il quadro clinico e altri metodi diagnostici (come l'isolamento dell'agente patogeno).

Un risultato negativo non esclude un'infezione esistente, poiché è possibile che il siero sia prelevato troppo presto per poter rilevare gli anticorpi. In questo caso, se si sospetta un'infezione per motivi clinici, il test deve essere ripetuto su un secondo campione di siero prelevato due o tre settimane dopo.

Da ogni paziente devono sempre essere prelevati e sottoposti a test sierologici in parallelo due campioni consecutivi di siero al fine di migliorare la qualità della diagnosi. L'evoluzione del titolo è importante per interpretare i risultati.

I risultati positivi delle IgG nei neonati devono essere interpretati con attenzione, poiché possono essere causati da anticorpi materni. La rilevazione degli anticorpi IgM è più utile per i bambini di età inferiore ai sei mesi.

Titoli IgG molto elevati possono portare a risultati falsi negativi durante le determinazioni di IgM. Inoltre, le determinazioni di IgM possono causare risultati falsi positivi dovuti a fattori reumatoidi. Questo può essere evitato assorbendo il siero prima di eseguire il test (vedere Sezione 9.3.).

Le reazioni crociate con anticorpi contro Chlamydoxiphila psittaci non sono state esaminate a causa della bassa prevalenza di questa malattia e della mancanza di campioni positivi quando si utilizza il test disponibile.

La risposta immunitaria per gli occhi infetti da *C. trachomatis* è limitata.

Il test non è stato convalidato per la sua idoneità al controllo della terapia. Non è stata studiata la significatività del test per malattie croniche nei bambini, nei pazienti con linfogranuloma venereo (LGV) e infiammazioni croniche della pelvi.

Un risultato positivo non esclude la presenza di un altro patogeno infettivo come causa della malattia.

13. Prestazioni e caratteristiche

Tab. 5: Varianza inter-analisi (n=10)

Varianza inter-analisi	IgG	IgM
	CV	CV
Controllo positivo	3,22 %	2,62 %
Controllo negativo	10,99 %	9,24 %
Controllo di cut-off	5,00 %	7,36 %

Tab. 6: Varianza intra-analisi (n=10)

Varianza intra-analisi	IgG	IgM
	CV	CV
Controllo positivo	1,83 %	2,16 %
Controllo negativo	6,98 %	8,00 %
Controllo di cut-off	6,55 %	7,79 %

Tab. 7: Sensibilità e specificità rispetto al test di micro-immunofluorescenza (MIF)

	IgG	IgM
Numero di campioni	101	62
Sensibilità	96 %	92 %
Specificità	98 %	100 %










Il test IgG è stato eseguito anche su 11 campioni di pazienti con infezione da *Rickettsia conorii* o altri patogeni che danno origine a quadri clinici simili a quelli della Chlamydia (HSV-2, *L. pneumophila*, *C. burnetii* e *M. pneumoniae*). Sette di questi campioni sono stati esaminati nel test IgM come pure in due sieri con fattore reumatoide positivo. Non sono state riscontrate reazioni crociate o effetti sui risultati ELISA per i sieri esaminati.

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e nome
2015-11-01	Versione di rilascio
2018-08-15	Revisione generale
2018-09-20	Adattamento simbolo CE (N. identificazione Organismo notificato)
2019-12-16	Revisione 6.1. Reagenti Revisione 9.3. Preparazione dei campioni

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Attenersi alle istruzioni per l'uso
	Codice identificativo
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

Plate	Piastra da microtitolazione
Diluent	Tampone di diluizione del campione
Wash	Tampone di lavaggio 20x
Control IgG +	Controllo positivo IgG
Control IgM +	Controllo positivo IgM
Control IgG -	Controllo negativo IgG
Control IgM -	Controllo negativo IgM
Cut Off IgG	Controllo di cut-off IgG
Cut off IgM	Controllo di cut-off IgM
Conjugate IgG	Coniugato IgG
Conjugate IgM	Coniugato IgM
Substrate	Substrato
Stop	Reagente bloccante

16. Bibliografia

1. Finn, M. P., A. Ohlin, and J. Schachter. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G and M antibodies to *Chlamydia trachomatis* in human sera. J Clin Microbiol 17:848-52.
2. Gonen, R., Y. Shemer-Avni, P. A. Csango, B. Sarov, and M. G. Friedman. 1993. Serum reactivity to *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae* antigens in patients with documented infection and in healthy children by microimmunofluorescence and immunoblotting techniques. APMIS 101:719-26.
3. Gutierrez, J., J. Mendoza, F. Fernandez, J. Linares-Palomino, M. J. Soto, and M. C. Maroto. 2002. ELISA test to detect *Chlamydia pneumoniae* IgG. J Basic Microbiol 42:13-8.
4. Jauhainen, T., T. Tuomi, M. Leinonen, J. D. Kark, and P. Saikku. 1994. Interference of immunoglobulin G (IgG) antibodies in IgA antibody determinations of *Chlamydia pneumoniae* by microimmunofluorescence test. J Clin Microbiol 32:839-40.
5. Jones, R. B., S. C. Bruins, and W. J. Newhall 5th. 1983. Comparison of reticulate and elementary body antigens in detection of antibodies against *Chlamydia trachomatis* by an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 17:466-71.
6. Ladany, S., C. M. Black, C. E. Farshy, J. M. Ossewaarde, and R. C. Barnes. 1989. Enzyme immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). J Clin Microbiol 27:2778-83.
7. Mahony, J. B., J. Schachter, and M. A. Chernesky. 1983. Detection of antichlamydial immunoglobulin G and M antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 18:270-5.
8. Numazaki, K., T. Ikebe, and S. Chiba. 1996. Detection of serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* by ELISA. FEMS Immunol Med Microbiol 14:179-83.
9. Ossewaarde, J. M., A. de Vries, J. A. van den Hoek, and A. M. van Loon. 1994. Enzyme immunoassay with enhanced specificity for detection of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 32:1419-26.