



SeroELISA™ Chlamydia IgG

Imunoensaio ligado a uma enzima (ELISA) para detecção de anticorpos IgG específicos contra **Chlamydia** em soro humano

Manual de Instruções

Kit de testes para 96 determinações
(Catálogo N.º 111-01)

Para Diagnóstico In Vitro
Apenas para uso profissional
Armazenar a 2-8° C. **Não Congelar**

Savyon® Diagnostics Ltd
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnosics.com

Interesse Clínico

O kit SeroELISA™ Chlamydia IgG foi concebido para detecção de anticorpos específicos contra Chlamydia numa única amostra de soro humano ou avaliar um par de soros por um imunoensaio ligado a uma enzima (ELISA).

Para diagnóstico *In Vitro*.

Introdução

A Chlamydia é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória que provoca doenças agudas e crónicas tanto em espécies mamíferas como em aves. O género Chlamydia compreende quatro espécies: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* e *C. pecorum*.

C. trachomatis está dividida em 15 serovares (1). Os serovares A, B, Ba e C são agentes de tracoma (2), a principal causa de cegueira evitável, endémica nos países do terceiro mundo. Os serovares L₁-L₃ são agentes de linfogranuloma venéreo. Os serovares D-K são a causa mundial mais comum de infecções genitais sexualmente transmissíveis: cervicite, endometrite/salpingite (3) nas mulheres e uretrite (4) tanto nos homens como nas mulheres. A endometrite/salpingite poderá conduzir à oclusão tubular, aumentando o risco de gravidez extra-uterina e de infertilidade. A infecção genital poderá causar uma infecção aguda e persistente, ocasionalmente sem quaisquer sintomas clínicos. Geralmente, estas infecções são tratáveis aquando do seu diagnóstico. No entanto, sem qualquer tratamento, a infecção poderá progredir para uma inflamação crónica severa, conduzindo a infertilidade, gravidez ectópica, indução de aborto e parto prematuro. Além do mais, crianças de mulheres infectadas podem ser

infectadas aquando do nascimento, podendo provocar conjuntivites ou pneumonia (5).

A *C. pneumoniae* é um patógeno respiratório importante nos humanos e provoca até 10% dos casos de pneumonia adquirida em comunidade. Foi associada a doenças respiratórias agudas, pneumonia, asma, bronquite, faringite, síndrome pulmonar agudo da drepanocitose, doença coronária e síndrome Guillain-Barré (6).

A *C. psittaci* infecta uma gama de espécies hospedeiras diversa, desde moluscos até aves e mamíferos e também provoca pneumonia severa.

Os testes serológicos, que se baseiam em marcadores imunológicos específicos, são usados como ferramenta não invasiva de diagnóstico para identificação tanto de infecções distais como profundas (7). Descobriu-se que títulos elevados de anticorpo IgG anti-Chlamydia são indicativos de infecção activa (3,8).

Níveis elevados de anticorpos IgG anti-Chlamydia têm um valor de diagnóstico em infecções crónicas ou sistémicas tais como salpingites, infertilidade mecânica, perihepatites, epididimites, síndrome de Reiter e pneumonias (3, 9, 10).

A Savyon Diagnostics desenvolveu um imunoensaio (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG específicos para a Chlamydia.

O teste SeroELISA™ Chlamydia emprega o antigénio serovar L₂, da *C. trachomatis*, de reacção alargada. Detecta anticorpos anti *C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae* (TWAR).

Fundamento do teste

- O soro humano a ser testado é posto em contacto com o material antigénico que reveste os poços da microplaca. Os anticorpos específicos, se presentes no soro do paciente ligar-se-ão ao correspondente antigénio, formando um complexo e todos os componentes do soro são removidos na etapa de lavagem.
- O conjugado anti IgG humano (específico da cadeia γ) marcado com peroxidase de rábano (HRP) é adicionado aos poços da microplaca. Se o complexo antigénio-anticorpo se formou na etapa anterior, o conjugado com peroxidase irá ligar-se a meio do anticorpo do complexo. Se o complexo antigénio-anticorpo não se formou na etapa anterior, o conjugado é removido na etapa de lavagem.
- O substrato TMB é adicionado. Uma reacção positiva é indicada pelo aparecimento de uma cor azul ou azul escuro que se desenvolve nos poços através da reacção enzimática da peroxidase com o peróxido cromogénico reactivo. Após paragem da reacção enzimática com uma solução ácida, as absorvâncias dos poços são lidas num espectrofotómetro a 450nm.
- A absorvância a 450nm é indicativa do título de IgG anti-Chlamydia nas amostras de soros dos pacientes.

Procedimento

1. Antígeno da Chlamydia ligado à fase sólida (Ag) + Soro positivo para IgG Anti-Chlamydia (Ab₁)
↓
Complexo AgAb₁
2. Complexo AgAb₁ + Conjugado HRP Anti IgG humano (Ab₂)
↓
Complexo AgAb₁Ab₂
3. Complexo AgAb₁Ab₂ + Substrato TMB
↓
Solução azul
↓ ← Solução Stop
Solução amarela
(Leitura de Absorvâncias a 450nm)

Aviso e Precauções

- **Aviso:** OS MATERIAIS ANTIGÉNICOS DE CHLAMYDIA FORAM INACTIVADOS E NÃO CONTÊM ORGANISMOS VIVOS DETECTÁVEIS. NO ENTANTO, AS TIRAS DEVEM SER CONSIDERADAS E MANIPULADAS COMO MATERIAL DE LABORATÓRIO POTENCIALMENTE PERIGOSO.
Precauções: Este kit contém soros humanos que foram testados por técnicas aprovadas pela FDA, e deram resultados negativos para antígenos de HBV e para anticorpos de HCV, VIH 1 e VIH2. Uma vez que nenhum método oferece segurança total quanto à não transmissibilidade de infecções a partir de sangue humano, todos os componentes sanguíneos, fornecidos neste kit, devem ser manipulados como soros ou sangue potencialmente infecciosos, de acordo com as recomendações publicadas no manual da CDC/NIH "Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos, 1988".
- A Solução Substrato/Cromogénico é um produto que provoca irritação na pele e membranas mucosas. Evitar o contacto directo.
- **Para Diagnóstico *In Vitro***

Composição do Kit

1. Microplaca pré-revestida (96 poços). Cada embalagem contém uma microplaca constituída por 12 tiras removíveis colocadas num suporte plástico. Cada tira está revestida com antígenos de Chlamydia.
1 Unidade
2. Controlo Positivo (soro humano positivo para anticorpos IgG anti-Chlamydia). Pronto a usar
1 Frasco, 2.0ml
3. Controlo Positivo baixo (soro humano positivo baixo para anticorpos IgG anti-Chlamydia). Pronto a usar.
1 Frasco, 2.0ml

4. Controlo Negativo (soro humano negativo para anticorpos IgG anti-Chlamydia). Pronto a usar
1 Frasco, 2.0ml
5. Conjugado HRP Anti-IgG Humano (específico para a cadeia γ). Pronto a usar
1 Frasco, 10ml
6. Diluente de Soro. Pronto a usar.
1 Frasco, 40ml
7. Tampão de Lavagem concentrado (20x)
1 Frasco, 100ml
8. Substrato -TMB. Pronto a usar.
1 Frasco, 14ml
9. Solução Stop (H₂SO₄ 1 M). Pronto a usar.
1 Frasco, 15ml
10. Tampa da placa
1 Unidade
11. Manual de Instruções
1

Material necessário mas não fornecido

1. Tubos de ensaio limpos para diluição das amostras de soro.
2. Micropipetas ajustáveis ou pipeta multicanal (5-50, 50-200 e 200-1000 μ l) e pontas descartáveis.
3. Pipetas de plástico descartáveis (tamanhos sortidos) e dispositivos para aspiração.
4. Balão volumétrico de um litro.
5. Proveta volumétrica de 50ml.
6. Lavador ELISA ou frasco de lavagem para ELISA.
7. Toalhas de papel ou papel absorvente.
8. Agitador vortex.
9. Banho a 37°C com cobertura, ou câmara húmida colocada numa incubadora a 37 \pm 1°C.
10. Leitor de ELISA com filtro de 450nm.
11. Água destilada ou desionizada para diluição do Tampão de Lavagem concentrado.

Conservação e Estabilidade dos Reagentes

Todos os materiais fornecidos deverão ser armazenados 2 $^{\circ}$ - 8 $^{\circ}$ C. Quando mantidos a esta temperatura, os reagentes do teste permanecerão estáveis até expiração da data de validade indicada na embalagem do kit. A exposição de componentes, fechados ou selados na origem, à temperatura ambiente por algumas horas não irá provocar danos nos reagentes. **NÃO CONGELAR!** Quando um kit está a uso, o material original permanecerá estável durante 60 dias a partir do dia da sua abertura. Uma vez aberto, a embalagem de alumínio que contém as tiras deverá ser selado com fita-cola. Não deverá ser removido o pacote desidratante.

Colheita das amostras

As amostras de soro deverão ser colhidas assepticamente e armazenadas a 2 $^{\circ}$ - 8 $^{\circ}$ C com 0.05% de azida sódica (NaN₃) como conservante se forem analisadas dentro de alguns dias. Para períodos mais longos, alíquotas dos soros deverão ser mantidas a -20°C. Soros turvos ou hemolisados poderão originar resultados menos reprodutíveis, logo é altamente recomendável que as amostras dos soros a testar sejam límpidas e não hemolisadas.

Procedimento da Análise

Notas:

- Os componentes do kit foram testados como unidade. Não misturar componentes de kits de lotes diferentes ou com outros kits do mesmo fabricante.
- Todos os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente antes da sua utilização. O Diluente do Soro e o Diluente do Conjugado gelificam quando refrigerados. Se necessário, acelerar a liquefação aquecendo estes componentes a 37°C durante alguns minutos. Podem formar-se cristais de sal no Tampão de Lavagem concentrado quando armazenando a 2° - 8°C. estes cristais deverão ser completamente dissolvidos a 37° C antes da diluição.
- Não proceder ao teste na presença de vapores reactivos (por exemplo, de ácidos, de substâncias alcalinas ou de aldeídos) ou poeira, pois a actividade enzimática do conjugado HRP Anti-IgG Humana poderá ficar afectada.
- Não tocar no topo das tiras. Não tocar no limite dos poços com as pontas aquando da distribuição dos reagentes.
- Usar pontas descartáveis. Evitar contaminação cruzada entre reagentes.
- Bater levemente o frasco sobre uma superfície dura para libertar o líquido possivelmente retido na tampa.
- Evitar a formação de bolhas de ar nos poços.
- Dispensar os reagentes líquidos lentamente para evitar salpicos.
- Os soros Controlo Positivo, Positivo baixo e Negativo deverão ser testado em simultâneo com as amostras de soros, todas as vezes que se proceda a um teste.
- Um poço por teste deverá ser usado como valor do branco, todas as vezes que se proceda a um teste.
- Todos os passos do procedimento deverão ser realizados sequencialmente sem interrupções.

Procedimento do teste - Manual

Protocolo para automatização, disponível sob requisição

A) Lavagem das Tiras

É aconselhável a pré-lavagem das tiras mas não obrigatório. Em qualquer dos casos, as tiras deverão ser molhadas com solução Tampão de Lavagem e devem ser secas batendo levemente sobre papel absorvente limpo, antes da aplicação das amostras a testar.

Se não houver uma placa de lavagem de ELISA automática deverá seguir-se o seguinte procedimento:

- Remover o número desejado de tiras da sua embalagem de alumínio e inserir no suporte de tiras.
- Fazer uma diluição a 1:20 do Tampão de Lavagem concentrado com água destilada.
Por exemplo: Para uma tira preparar 100ml de Tampão de Lavagem (5ml de Tampão de Lavagem concentrado com 95ml de água destilada). Agitar suavemente durante 20 minutos.
A solução Tampão de Lavagem só deverá ser preparada imediatamente antes de usar e o excesso deverá ser descartado.

- Encher cada poço com solução Tampão de Lavagem até ao meio.
- Permitir impregnação durante 2 minutos, depois remover o conteúdo da(s) tira(s). Repetir este passo **cinco** vezes.
- Secar o topo das tiras batendo suavemente sobre papel absorvente limpo.
É essencial a lavagem completa dos poços após incubação para obtenção de melhores resultados.. Não se deverão deixar resíduos de Tampão de Lavagem nos poços.

B) Incubação das Amostras de Soro e dos Controlos

- Diluir cada soro do paciente a 1:256 com o Diluente de soro fornecido do seguinte modo:
1:16 - Adicionar 10 µl de soro do paciente a 150 µl de Diluente de soro
1:256 - Adicionar 10 µl da diluição a 1:16 a 150 µl de Diluente de soro.
Os controlos são fornecidos pronto a usar e não devem ser diluídos.
- Pipetar 50 µl de Controlo Positivo, Positivo baixo e Controlo Negativo prontos a usar, e amostras de soro (diluídas a 1:256) nos poços correspondentes das tiras de teste.
Pipetar 50 µl do diluente de soro num poço para valor de branco.
A pipetagem de controlos e amostras nos poços não deve exceder 10 minutos.
- Cobrir as tiras com a tampa da placa e incubar durante 30 minutos a 37°C numa câmara húmida.
- Descartar o conteúdo líquido dos poços. Lavar os poços **cinco** vezes e secar como nos passos A) 3-5.

C) Incubação com Conjugado

- Adicionar 50µl de solução Conjugado HRP Anti-IgG Humana a cada poço.
- Cobrir as tiras com a tampa da placa e incubar durante 30 minutos a 37°C numa câmara húmida.
- Remover o conteúdo líquido dos poços, lavar **cinco** vezes e secar como nos passos A) 3-5.

D) Incubação com Substrato -TMB

- Adicionar 100µl de Substrato -TMB em cada poço.
- Cobrir as tiras com a tampa da placa e incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Parar a reacção adicionando 100µl de Solução Stop em cada poço.
Ao adicionar a solução stop, utilizar a mesma sequência e o mesmo intervalo de tempo utilizados na adição do Substrato -TMB no passo 14.
- Calibrar o espectrofotómetro com o poço correspondente ao branco. Determinar a absorvância a 450 nm e registar os resultados.
É aconselhável a determinação imediata da absorvâncias não é obrigatória. A determinação da absorvância não deverá exceder os 30 minutos após paragem da reacção cromogénica.

Validação do Teste

Um teste é válido quando:

- A absorvância do Controlo Positivo é ≥ 0.8 a 450nm
- A Absorvância do Controlo Positivo Baixo é ≥ 0.4 a 450nm
- A absorvância do Controlo Negativo é ≤ 0.15 a 450nm.

Se estas condições não foram cumpridas, o teste decorrido é inválido e deverá ser repetido.

Cálculo do Valor de Cut-off (COV)

O valor de cut-off é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$COV = 0.154 \times (Cp - Cn) + Cn$$

Cp = Absorvância do Controlo Positivo a 450nm

Cn = Absorvância do Controlo Negativo a 450nm

Interpretação dos Resultados

Absorvância a 450nm	Interpretação dos Resultados	Título de IgG anti Chlamydia estimado
Inferior a COV - 0.03	Negativo	< 256
COV ± 0.03	Duvidoso*	256
Superior a COV ± 0.03 e inferior ao Controlo Positivo Baixo	Positivo Baixo	256 - 512
Acima do Controlo Positivo Baixo e inferior ao Controlo Positivo	Positivo	1024 - 2048
Acima do Controlo Positivo	Positivo alto	≥ 2048

* Repetir as amostras classificadas como duvidosas. Se o resultado duvidoso se repetir, é recomendável testar uma nova amostra.

Significado dos resultados

A experiência clínica e os estudos recentes, indicam que níveis elevados de anticorpos IgG para a Chlamydia podem servir como marcador para a infecção activa ou crónica a Chlamydia.

Determinação do Título final

Para monitorizar o perfil de imunidade de um paciente, devem-se comparar os soros de amostras do estado agudo e convalescente. A titulação final do par de soros deve ser executada em conjunto no mesmo ensaio. A diluição de soro mais elevada com uma absorvância acima do valor de cut-off é o título final.

Limitações do teste

- Não se deverá usar apenas um teste serológico como critério de diagnóstico. Deverão ser tidos em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.
- O teste é um ensaio ELISA de um só serovar (L₂). O L₂ contém determinantes antigénicos existentes tanto em serovares de *Chlamydia trachomatis* como no grupo antigénico. Com este teste ELISA poderão ser detectados anticorpos contra *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) a *Acinetobacter calcoaceticus*.

- O significado dos títulos das amostras deve ser considerado em relação às características da população estudada. Estas características devem incluir a idade, localização geográfica e comportamentos sexuais, além de outros factores.
- Este teste não indica o local de infecção por Chlamydia. Não substitui o isolamento por cultura, quando disponível.
- A ausência de anticorpos detectáveis no soro não exclui a possibilidade de infecção por Chlamydia.
- Soros contaminados por bactérias ou hiperlipémicos poderão originar resultados erróneos.

Características de Desempenho

O teste SeroELISA™ Chlamydia foi comparado com o teste IPAzyme™ Chlamydia IgG/IgA (produto da Savyon Diagnostic Ltd, Catálogo N.º 011-01) que é um teste serológico aceite para detecção de anticorpos IgG anti-Chlamydia.

A população estudada incluiu pacientes com suspeita de infecção por Chlamydia e indivíduos saudáveis (n=328). Os resultados estão sumariados da seguinte forma:

Comparação de SeroELISA™ e IPAzyme™

SeroElisa™ \ IPAzyme™	Positivo	Negativo	Total
IPAzyme™ Positivo	116	8	124
IPAzyme™ Negativo	10	194	204
Total	126	202	328

Concordância geral: (310/328) x 100 = 94.5%

Reacções Cruzadas

Pacientes hospitalizados, infectados com *Neisseria gonorrhoea*, *Staphylococcus aureus* e *Peptostreptococcus anaerobius*, cujos diagnósticos foram realizados com kits serológicos, também foram testados com o kit SeroELISA™ Chlamydia. Não foram detectadas reacções cruzadas significativas.

Bibliografia



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

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., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V.** (1985) Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by immunoperoxidase assay. *Eur. J. Epidemiol.* 1: 110-116.
4. **Wang, S.P., Grauston, J.T., Kuo, C.C., Alexander, E.R. and Holmes, K.K.** (1977) SeroDiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the microimmunofluorescence test. In: Nongococcal 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 Infection Diseases*. 4: S747
6. **Saikkku, P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leiononen, 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.