



SeroELISA™ Chlamydia TRUE IgM

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

Manual de Instruções

Kit de testes para 96 determinações
(Catálogo N.º 112-01)

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

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

Interesse Clínico

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

Para diagnóstico *In Vitro*.

Introdução

Chlamydia é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória que provoca doenças agudas e crónicas quer em espécies mamíferas como de 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).

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).

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

Os testes serodiagnósticos, 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 o anticorpo IgM ANTI-Chlamydia é de grande valor para o diagnóstico de pneumonias provocadas por *C. pneumoniae* (TWAR) e *C. psittaci* (8). O padrão serológico das IgM em pneumonias por Chlamydia é o seguinte: os anticorpos são produzidos num estágio inicial de uma infecção, apresentam um pico máximo após 1-2 semanas e geralmente apresentam um declínio gradual até atingir níveis indetectáveis cerca de 2-3 meses depois (11).

Este padrão tem sido observado em 20-50% das crianças descendentes de mulheres que apresentam culturas positivas quando testadas para *Chlamydia trachomatis* e/ou que demonstraram níveis elevados de anticorpos IgG e IgA específicos contra Chlamydia. Estas crianças desenvolveram pneumonia por Chlamydia durante os primeiros 6 meses de vida (7).

Uma vez que as IgM só estão presentes no caso de uma doença aguda e/ou recente, o teste IgM Chlamydia requer apenas uma única amostra de soro e os resultados poderão ser observados em termos de presença ou ausência de IgM.

Elevados títulos de IgG, que competem com as IgM para os mesmos sítios antigénicos, poderão produzir resultados IgM falso positivos. O factor reumatóide (RF com actividade auto-imune) provoca resultados IgM falso positivos (10). Assim, a remoção de IgG e RF é um passo essencial para o procedimento IgM.

O teste SeroELISA™ Chlamydia emprega o antigénio sorovar L₂, de *C. trachomatis*, largamente reactivo. Detectará anticorpos *C. trachomatis*, *C. psittaci* e *C. pneumoniae* (TWAR).

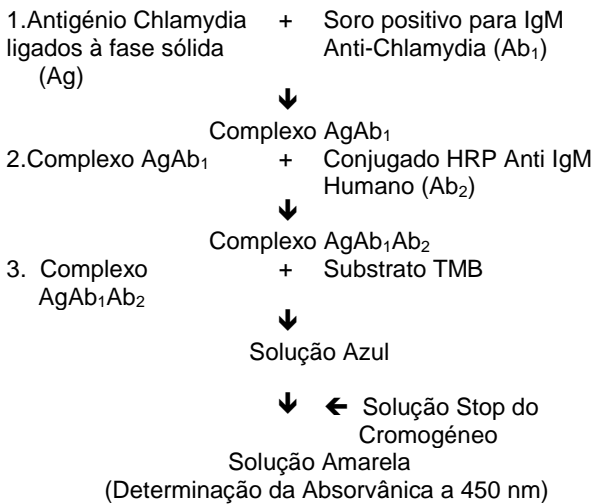
Fundamento do teste

- O soro humano a testar tem de ser posto em contacto com o revestimento de material antigénico dos poços da placa de microtitulação. O anticorpo específico, quando presente no soro do paciente, liga-se ao antigénio, que reveste a placa, forma um complexo antigénio-anticorpo e todos os restantes componentes do soro são removidos aquando da fase de lavagem.
- Anti-IgM humano (específico contra a cadeia μ) conjugado com peroxidase de rábano (HRP) é adicionado aos poços. Se se formar um complexo antigénio-anticorpo no passo anterior, o anticorpo conjugado à peroxidase irá ligar-se a meio do anticorpo do complexo. Se não se formar o complexo antigénio-anticorpo, o conjugado será removido na fase de lavagem.
- É adicionado Substrato-TMB. A reacção positiva é indicada por uma coloração azul, que se

desenvolve nos poços testes após a reacção enzimática entre a metade da peroxidase com o peróxido e o reagente cromagénico. Depois de terminada a reacção enzimática por adição de solução ácida Stop, a absorbância dos poços é determinada a 450 nm num espectrofotómetro.

- A absorbância a 450 nm é indicativa da presença de títulos de IgM anti-Chlamydia nas amostras de soro dos pacientes

Procedimento



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, HIV 1 e HIV2. 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. Placa de microtitulação 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 IgM anti-Chlamydia). Pronto a usar. **1 Frasco, 2,0 ml**
3. Controlo Negativo (soro humano negativo para anticorpos IgM anti-Chlamydia). Pronto a usar. **1 Frasco, 2,0 ml**
4. Conjugado HRP Anti-IgM Humano (específico para a cadeia μ). Pronto a usar. **1 Frasco, 10 ml**
5. Diluente do Soro IgM. Pronto a usar. **1 Frasco, 60 ml**
6. Tampão de Lavagem concentrado (20x) **1 Frasco, 100 ml**
7. Substrato-TMB. Pronto a usar. **1 Frasco, 14 ml**
8. Solução Stop (H_2SO_4 1 M). Pronto a usar. **1 Frasco, 15 ml**
9. Tampa da placa **1 Unidade**
10. 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. Placa ou frasco de lavagem para ELISA.
7. Toalhas de papel ou papel absorvente.
8. Agitador automático (vortex).
9. Banho a 37°C com cobertura, ou câmara húmida colocada numa incubadora a 37° \pm 1°C.
10. Refrigerador a 4°C.
11. Leitor de ELISA com filtro de 450nm.
12. Água destilada ou desionizada para diluição do Tampão de Lavagem concentrado.

Conservação e Estabilidade dos Reagentes

Todos os materiais fornecidos deverão ser armazenados 2° - 8°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 asepticamente e armazenadas a 2° - 8°C com 0.05% de azida sódica (NaN_3) 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 liquefacção 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 previamente à 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-IgM 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 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 diluição de 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.

- Após período de incubação, 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 **duas** 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 a amostra de soro 1:105 com o diluente do soro fornecido, adicionando 10 µl de amostra de soro a 200 µl de diluente de soro (1/21), e posterior diluição de 25 µl da diluição 1/21 com 100 µl de diluente de soro IgM.
Nota: O Diluente do Soro IgM contém Anti-IgG Humana para que haja remoção de anticorpos IgG do soro humano.
- Adicionar 50µl de Controlo Positivo, Controlo Negativo e amostras diluídas (1:105) para os poços correspondentes nas tiras de teste.
Adicionar 50µl de Diluente de Soro IgM para um poço, correspondente ao valor do branco.
O tempo para dispensar todas as amostras e controlos não deverá exceder os 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-IgM 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.
- Para a reacção adicionando 100µl de Solução Stop em cada poço.
Aquando da adição desta solução, 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 absorvância mas 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 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:

$$\text{COV} = 0.24 \times (\text{Cp} - \text{Cn}) + \text{Cn}$$

Cp = Absorvância do Controlo Positivo a 450nm

Cn = Absorvância do Controlo Negativo a 450nm

Interpretação dos Resultados

Absorvância a 450nm	Resultado	Interpretação dos Resultados
Inferior a COV - 0.03	Negativo	Anticorpos IgM anti-Chlamydia não detectáveis
COV \pm 0.03	Duvidoso	Repetir teste da amostra classificada como duvidosa. Se persistir o resultado duvidoso, é recomendável testar amostras subsequentes do mesmo paciente
Superior a COV + 0.03	Positivo	Indicação de infecção aguda e/ou recente por Chlamydia

Limitações do teste

- Para o diagnóstico, não se deverá usar apenas um testes serológico. Deverá 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*.
- Este teste não indica o local de infecção por Chlamydia. Não substitui o isolamento por cultura, quando disponível.
- Uma vez que a infecção por Chlamydia poderá não provocar de imediato sintomas significativos, o estágio agudo poderá ser falhado e poderão já não existir anticorpos IgM detectáveis. Isto 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 TRUE-IgM™ (produto da Savyon Diagnostic Ltd, Catálogo N.º 012-01) que é um teste serológico aceite para detecção de anticorpos IgM anti-Chlamydia.

A população estudada incluiu pacientes com suspeita de infecção por Chlamydia e indivíduos saudáveis (n=162). Os resultados estão sumariados da seguinte forma:

Comparação de SeroELISA™ e IPAzyme™

SeroElisa™ \ IPAzyme™	Positivo	Negativo	Total
Positivo	76	4	80
Negativo	4	78	82
Total	80	82	162

Concordância geral: $(154/162) \times 100 = 95.1\%$

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

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. Treharne, 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: *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 Infection 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. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, V., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984) Chlamydial Pneumonitis and its Serodiagnosis in Infants. *J. Infect. Dis*. 149: 598-604.
8. Grayson, J.G (1989) Chlamydial pneumoniae, Strain TWAR. *Chest* 95: 664-669.
9. Gardner, P.S., Rapid Virus Diagnosis. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds.) *Immunoassays for the 80s*, pp. 353-360 MTP Press Limited 1981.
10. Chantler, S. and Diment, J.A. Current Status of Specific IgM Antibody Assays. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds.) *Immunoassays for the 80s*, pp. 417-430 MTP Press Limited 1981.
11. Numazaki, K., Chiba, S., Yamanaka, T., Moroboshi, T., Aoki, K., Nakao, T. (1985) Detection of IgM Antibodies against *Chlamydia trachomatis* by Enzyme Linked Fluorescence Immunoassay. *J. Clin. Pathol*. 38: 733-739.



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