



## SeroELISA™ Chlamydia IgA

**ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)  
pro stanovení protilátek IgA proti Chlamydiím  
v lidském séru.**

**Testovací souprava pro 96 stanovení.**  
(Katalogové č. 113-01)

Skladujte při 2 – 8°C. **Nezmrazujte.**  
Pouze pro profesionální použití  
Pouze pro **In Vitro** stanovení.

**Dovází: GALI spol. s r.o.**

Libštát 314, 512 03  
Tel. 481 689 050  
Fax. 481 689 051  
E-mail: [info@gali.cz](mailto:info@gali.cz)

**Vyrábí: Savyon Diagnostics Ltd.**

3 Habosem St. Ashdod 7761003  
ISRAEL  
Tel. +972.8.8562920  
Fax. +972.8.8523176

E-mail: [support@savyondiagnosics.com](mailto:support@savyondiagnosics.com)

### Použití

Tento test se používá pro stanovení specifických IgA protilátek proti Chlamydiím ve vzorku lidského séra metodou ELISA.

**Pro In Vitro diagnostické účely.**

### Úvod

Chlamydie jsou gram-negativní, intracelulární parazitující bakterie, které u savců způsobují akutní a chronická onemocnění. Vyskytují se čtyři druhy: *Ch. trachomatis*, *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci* a *Ch. pecorum*.

*Ch. trachomatis* je rozdělena do 15 sérotypů(1). Serotypy A, B, Ba a C se pojí s trachomem (2). Serotypy L<sub>1</sub> - L<sub>3</sub> jsou odpovědné za infekční venerickou chorobu postihující lymfatickou tkáň. D až K se pojí se sexuálně přenosnými infekčními onemocněními: cervicitida, endometritida, salpingitida (3) u žen a zánět močovodu (4) u žen i u mužů. Endometritida/salpingitida může vést k tubální okluzi s vysokým rizikem mimoděložního těhotenství a infertilitě. Genitální infekce může být příčinou akutní nebo přetrvávající infekce, někdy bez jakýchkoli klinických příznaků. Pokud se onemocnění diagnostikuje, je léčitelné. Bez léčby toto onemocnění postupuje a může být příčinou chronických zánětů vedoucích k infertilitě, mimoděložnímu těhotenství, umělým potratům, předčasným porodům. Mimoto, novorozenec nakažený matkou může být infikován během porodu, což může být příčinou zánětu oční spojivky nebo pneumonie (5).

*Ch. pneumoniae* je důležitý respirační patogen, bývá nalezena asi u 10 % starších dospělých s „community acquired“ pneumonií. *Ch. pneumoniae* je asociována s infekcemi horních a dolních cest dýchacích, pneumonií, astmatem, bronchitidou, faryngitidou, výskytem srpkovitých erytrocytů, koronárním srdečním onemocněním a Guillain-Barre syndromem (6).

*Ch. psittaci* jsou primárními patogeny různých druhů živočichů. Měkkýši, ptáci, savci, mohou být důvodem některých případů pneumonií.

Sero-diagnostické testy, které používají specifické imunologické značení, slouží jako neinvazivní diagnostický nástroj při identifikaci infekcí (7).

Bylo zjištěno, že specifické IgA protilátky proti Chlamydii jsou spolehlivým markerem primární, chronické a opakované infekce (8). Bylo zjištěno, že anti-Chlamydia IgA protilátky jsou detekovatelné na diagnostické hodnotě u pacientů s nekonokokovou uretritidou (NGU) (9), u žen s akutní salpingitidou a mechanickou infertilitou (10), při mimoděložním těhotenství, prostatitidě, epididymitidě, zánětu spojivek, u Reiterova syndromu (10) a pneumonitidě.

Sero ELISA Chlamydia test využívá L<sub>2</sub> serovar (široce reaktivní antigen *Ch. trachomatis*), který stanovuje protilátky *Ch. trachomatis*, *Ch. psittaci* a *Ch. pneumoniae* (TWAR).

### Princip testu.

- V prvním kroku se lidské sérum přeneso na mikrotitrační destičku. Specifická protilátka přítomná v séru pacienta se naváže na antigen navázaný na mikrodestičce a vytvoří se komplex antigen-protilátka. Jestliže testované sérum neobsahuje protilátku pro tento druh antigenu, nevznikne komplex a všechny komponenty séra jsou vymyty v promývací fázi testu.
- V druhém kroku se přidává křenová peroxidáza (HRP) konjugovaná s anti-lidskou IgA ( $\alpha$ -specifický řetězec) protilátkou. Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen-protilátka, HRP značená protilátka se naváže na protilátku a vytvoří komplex. Jestliže se v prvním kroku nevytvořil komplex antigen-protilátka, je konjugát vymyt v promývacím kroku.
- Ve třetím kroku je do jamek přidáván chromogenní substrát, který při pozitivní enzymatické reakci vytvoří modré zbarvení. Enzymatická reakce je ukončena stop činidlem (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- Absorbance se měří při 450nm. Výsledkem testu je titr IgA anti-Chlamydia protilátek ve vzorku séra pacienta.

## Přehled kroků

1. Chlamydiový Antigen + Sérum pozitivní na IgA Anti-Chlamydia (Ab<sub>1</sub>)  
navázaný na pevné fázi (Ag)  
↓  
AgAb<sub>1</sub> komplex
2. AgAb<sub>1</sub> komplex + HRP konjugovaný Anti-lidské IgA (Ab<sub>2</sub>)  
↓  
AgAb<sub>1</sub>Ab<sub>2</sub> komplex
3. AgAb<sub>1</sub>Ab<sub>2</sub> komplex + TMB-Substráte  
↓  
Modrý roztok  
↓ ← Chromogen Stop roztok  
Žlutý roztok  
(Měření absorbance při 450nm)

## Upozornění

- Chlamydiový antigenní materiál byl inaktivován a neměl by obsahovat detekovatelné živé organismy. Přesto s tímto materiálem zacházejte jako s možným biologicky nebezpečným laboratorním materiálem. Opatření: Složky lidského séra v testovacích soupravách jsou testovány metodami schválenými FDA a neobsahují povrchový antigen Hepatitidy B (HbsAg) a protilátku k viru HIV. Přesto zacházejte se složkami lidského séra a se vzorky séra pacienta jako s biologicky nebezpečným materiálem.
- Roztok chromogenního substrátu působí dráždivě na pokožku a mukózní membrány. Vyvarujte se přímého kontaktu.
- **Pouze pro in-vitro diagnostické použití!**

## Součásti kitu

1. mikrodestička (8x12 jamek v rámečku), 12 stripů, potažená antigenem Chlamydie **1**
2. Pozitivní kontrola (lidské sérum pozitivní na IgA protilátky proti Chlamydiím); v pracovní koncentraci **1 lahvička, 2.0ml**
3. Nízce pozitivní kontrola (lidské sérum nízko pozitivní na IgA protilátky proti Chlamydiím), v pracovní koncentraci **1 lahvička, 2.0ml**
4. Negativní kontrola (lidské sérum negativní na IgA protilátky proti Chlamydiím), v pracovní koncentraci **1 lahvička, 2.0ml**
5. HRP-konjugát připraven k použití anti-lidské IgA ( $\alpha$ -řetězec specifický), v pracovní koncentraci **1 lahvička, 10ml**
6. Roztok na ředění vzorků sér, v pracovní koncentraci **2 lahvička, 60ml**
7. Promývací pufr (Concentrated Wash Buffer); 20x koncentrovaný **1 lahvička, 100ml**
8. TMB substrát, v pracovní koncentraci **1 lahvička, 16ml**

9. Stop roztok (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), v pracovní koncentraci **1 lahvička, 16ml**
10. fólie na přikrytí destičky **1**
11. návod **1**

## Potřebný materiál, nedodávaný v soupravě

1. naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta
2. vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000  $\mu$ l) a špičky
3. plastové pipety na jedno použití (různých rozměrů) a bezpečnostní pipetovací nástavec
4. jednolitrová volumetrická láhev
5. 50 ml volumetrický válec
6. promývač ELISA destiček nebo promývací nádoba
7. filtrační papír
8. vortexové míchadlo
9. vodní lázeň s víčkem (37 $\pm$  1°C) nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37 $\pm$  1°C)
10. reader s filtrem 450 nm pro měření mikrodestiček
11. destilovaná nebo dvakrát deionizovaná voda pro ředění promývacího pufru (Wash Buffer)

## Uchovávání a trvanlivost reagensů

Všechny dodaný materiál musí být uchováván při teplotě 2-8°C. Při této teplotě zůstávají testovací reagenty stabilní po dobu expirace vyznačené na obalu. Ponecháte-li originálně zabalené nebo zaplombované složky v okolní teplotě po dobu několika hodin, nedojde k poškození reagensů.

### NEMRAZTE !!!

Trvanlivost otevřené soupravy je 60 dní ode dne otevření. Lahvičky s otevřenou hliníkovou fólií zalepujte lepicí páskou a přidejte balíček se sušidlem.

V koncentrovaném promývacím pufru 20x se mohou během skladování tvořit krystalky. Toto je běžné. Krystalky rozpustíte zahřátím pufru na 37°C ještě před jeho ředěním. Naředěný pufr skladujte při 2-8°C a to po dobu maximálně 21 dní.

## Odběr vzorků

Vzorky sér by měly být odebírány asepticky a uchovávány při teplotě 2-8°C s roztokem 0,05% azidu sodného (NaN<sub>3</sub>) použivate-li vzorky po dobu několika dní. Pro delší dobu použití uchovávejte potřebné množství séra při -20 °C. Kalné vzorky nebo vzorky s hemolytickým sérem mohou poskytovat méně reprodukovatelné výsledky. Proto používejte vždy čiré a nehemolytické vzorky.

## Pracovní postup

### Poznámky:

- a) Vždy používejte složky jen z jedné jediné testovací soupravy. Nemíchejte testovací soupravy s různou šarží nebo od jiného výrobce.
- b) Reagenty ponechte před použitím vytemperovat při laboratorní teplotě. Ředidla sér a konjugátů v chladu gelovatí, k odstranění gelu můžeme činidla zahřát na dobu několika minut na 37°C. Koncentrovaný promývací pufr při teplotě 2-8°C může tvořit krystalky solí, ty odstraníme zahřátím na 37°C před ředěním.
- c) Test neprovádějte v přítomnosti par kyselin, zásad nebo aldehydů, které mohou ovlivnit enzymovou aktivitu HRP konjugátu s anti-human IgA.

- d) Nedotýkejte se povrchu mikrodestičky. Při přidávání reagensů do jamek dbejte, aby nedošlo ke kontaktu špičky se stěnou jamky.
- e) Používejte vhodné pipetovací špičky. Vyvarujte se kontaminace jednotlivých reagensů.
- f) Lehkým klepnutím na stěnu destičky sklepněte přidávaný roztok.
- g) Vyvarujte se vzniku vzduchových bublin v jamkách.
- h) Přidávejte kapaliny pomalu, aby nedošlo k vystříknutí.
- i) S každou sérií měření sér by měla být současně proměřena pozitivní, nízká pozitivní a negativní kontrola.
- j) Jedna jamka testu je vždy určena pro stanovení hodnoty blanku při každém provedení testu.
- k) Všechny kroky by měly být prováděny postupně a bez přerušení.

### Pracovní postup - Ruční

**Aplikační listy pro automatické zpracování jsou na vyžádání**

#### **A) Promývání stripů**

*Doporučuje se promytí stripů před zahájením testu dle následujícího postupu:*

1. Vyndejte potřebné množství stripů z hliníkové fólie a vložte je do rámečku mikrodestičky.
2. Zředte koncentrovaný roztok promývacího pufru (Wash Buffer) v poměru 1:20 destilovanou vodou. Např. pro jeden strip připravte 100 ml promývacího pufru (5 ml Concentrate Wash Buffer a 95 ml destilované vody). Roztok promývacího pufru by měl být připraven před použitím. Zbytek zlikvidujte.
3. Promyjte stripy promývacím pufrem a poté obsah stripu zlikvidujte. Tento postup opakujte 2x.
4. Vysušte jednotlivé stripy jemným poklepáním na čistém filtračním papíru.

#### **B) Inkubace vzorků sér a kontrol.**

5. Každé sérum pacienta zředte ředícím roztokem (Serum Diluent) v poměru 1: 64 následovně:  
1:16 - 10 µl séra pacienta přidejte ke 150 µl ředícího roztoku (Serum Diluent)  
1:64 - 30 µl roztoku (ředění 1:16) přidejte k 90 µl ředícího roztoku (Serum Diluent)  
**KONTROLY JSOU V PRACOVNÍ KONCENTRACI NEŘEĎTE JE.**
6. Odpipetujte 50 µl pozitivní, nízká pozitivní a negativní kontroly a vzorku séra (ředěného 1:64) do příslušných jamek testovacího stripu. Odpipetujte 50 µl roztoku Serum Diluent do jamky určené pro hodnotu blanku. *Pipetování vzorků sér a kontrol nesmí překročit dobu 10 min.*
7. Přikryjte destičku fólií a inkubujte v mlžné komoře při 37°C po dobu 30 min.
8. Odstraňte přebytečné množství kapalin v jamkách. Promývejte a sušte (celkem **5x**) jamky stejným postupem jako v bodu A)

#### **C) Inkubování s konjugátem.**

9. Pipetujte 50µl HRP konjugátu připraveného k použití do každé jamky.
11. Přikryjte stripy víčkem a inkubujte po dobu 30 min. při 37°C v mlžné komoře.
12. Odstraňte přebytečné množství kapaliny z jamek a proveďte promývací postup popsany v A)3-5 celkem **5x**.

#### **D) Inkubování s TMB substrátem.**

13. Odpipetujte 100 µl substrátu do každé jamky.
14. Přikryjte stripy fólií a inkubujte při laboratorní teplotě 30 min.
15. Reakci ukončete přidáním 100 µl chromogenního stop činidla (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) do každé jamky. TMB substrát pipetujte ve stejném pořadí a ve stejném časovém intervalu jako jste postupovali v kroku D)14.
16. Nakalibrujte spektrofotometr na „blankové“ jamce; proměřte při 450 nm a výsledné hodnoty zapište. *Okamžité stanovení absorbance je možné, ale není nutné. Doba měření absorbance vzorku by neměla přesáhnout 30 min od proběhnutí chromogenní reakce.*

#### **Kritéria testu**

Test je validní jestliže:

- absorbance pozitivní kontroly je  $\geq 0,8$  při 450 nm
- absorbance nízké pozitivní kontroly je  $\geq 0,4$  při 450 nm
- absorbance negativní kontroly je  $\leq 0,15$  při 450 nm

Pokud nejsou splněny tyto podmínky, není test validní a musí být zopakován.

#### **Výpočet hodnoty Cut-Off (COV)**

Vzorec pro vypočítání hodnoty Cut-Off:

$$\text{COV} = 0,198 \times (\text{Pc} - \text{Nc}) + \text{Nc}$$

Pc = Absorbance pozitivní kontroly při 450 nm  
Nc = Absorbance negativní kontroly při 450 nm

## Vyhodnocení testu

Absorbance při 450nm	Interpretace výsledku	Titř Chlamydia IgA
pod COV – 0.03	Negativní	<64
COV ± 0.03	Neurčitě*	64
nad COV +0.03 až do slabě pozitivní kontroly	Slabě pozitivní	64-128
Nad slabě pozitivní kontrolou až do pozitivní kontroly	Positivní	256-512
Nad pozitivní kontrolu	Silně pozitivní	≥512

- výsledky v tomto intervalu jsou brány jako nejisté a doporučuje se proměřit znovu.

## Význam výsledků

Klinické zkušenosti a moderní studie naznačují, že hodnoty IgA protilátek proti Chlamydiím jsou významné pro zjišťování průběhu akutní nebo chronické infekce Chlamydiemi (3,11,12).

## Stanovení endpoint titru

Pro sledování imunitního profilu pacienta se musí srovnávat vzorky séra při akutní infekci a po rekonvalescenci. Titrace endpoint obou vzorků sér pacienta musí být prováděna v jednom měření. Nejvyšší ředění séra vykazující absorbanci vyšší než je hodnota cut-off je konečný titr.

## Omezení testu

- Jednotlivé serologické testy nemohou být používány jako jediné kritérium pro stanovení diagnózy. Musí se brát v úvahu všechny klinické a laboratorní výsledky.
- Test je ELISA pro jeden serovar (L<sub>2</sub>). L<sub>2</sub> obsahuje antigenní materiál existující jak v serovaru *Ch. trachomatis*, tak ve skupinovém antigenu. Testem se tedy také stanoví protilátky proti *Ch. psittaci*, *Ch. pneumoniae* (TWAR) a *Acinetobakter calcoaceticus*.
- Významnost titrů vzorků musí být brána v poměru k charakteristikám daným testovanou populací. Tyto charakteristiky zahrnují věk, zeměpisnou polohu, sexuální chování a další faktory.
- Tímto testem nelze lokalizovat infekci Chlamydiemi. Nelze jím nahradit stanovení prováděné kultivací buněk (pokud je to možné).
- Nepřítomnost protilátek v testovaném séru nevylučuje možnost chlamydiové infekce.
- Bakteriemi kontaminované nebo hyperlipemické sérum může vykazovat chybné výsledky.

## Charakteristika účinnosti

Porovnání SeroELISA Chlamydia IgA s testem IPAzyme Chlamydia IgA (serologický test pro stanovení protilátek IgG proti Chlamydiím od f. Savyon Diagnostics (kat.č. 011-01). Studie zahrnuje jak pacienty s podezřením na chlamydiovou infekci, tak zdravé pacienty (n=200). Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

### Srovnání SeroELISA™ s IPAzyme™

SeroELISA™ \ IPAzyme™	Positivní	Negativní	Total
Positivní	96	4	100
Negativní	7	93	100
Total	103	97	200

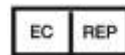
Celková shoda: (189/200) x 100 = 94.5%

## Zkřížená reaktivita

Hospitalizovaní pacienti, infikováni *Neisseria gonorrhoea*, *Staphylococcus aureus* a *Peptostreptococcus anaerobius*, kteří byli diagnostikováni komerčními serologickými testy, byli též testováni kitem SeroELISA Chlamydia. Zkřížená reaktivita nebyla detekována.

## Literatura

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., 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., B., Lunenfeld, E., Zion, H., Chaim, W. and Piura, B.** (1988) The significance of chlamydia Specific Serum IgA in Chlamydia trachomatis Infections. In Proceedings of The European Society for Chlamydia Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, pp.234-237.
8. **Sarov, I., Cevinini, R., Sarov, B., Romano, A., Regenbogen, L., Yassur, Y., David, R., Insler, V., Chaim, W., and Kleinman, D.** (1985) The significance of Specific Serum IgA Antibodies in the Diagnosis of Primary, Recurrent and Persistent Viral and Chlamydia Infections. *Rev. Int. Trach. Pathol. Ocul. Trop. Subtrop. Sante Publique*, Vol. 62 (1-2), pp. 21-34, ISSN: 0246-0831.
9. **Sarov, I., Insler, V., Sarov, B., Cevinini, R., Rumpianesi, F., Donati, M., Kleinman, D., Piura, B., Lieberman, J., Kimmel, N., Friedman, M. and La Placa, M.** (1984). Specific Serum IgA Antibodies in the Diagnosis of Active Viral and Chlamydial Infections. In: *New Horizons in Microbiology*, Elsevier Biomedical Press, ed. Sanna, A. and Morace, G. p. 157.
10. **Scheel, O. and Anestad, G.** (1989). Significance of Immunoglobulin A titers in the Diagnosis of Urogenital Chlamydial Infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 726-728.
11. **Sarov, I., Sarov, B., Lunenfeld, E., Zion, H., Chaim, W. and Piura, B.** (1988) The significance of chlamydia Specific Serum IgA in Chlamydia trachomatis Infections. In Proceedings of The European Society for Chlamydia Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, pp.234-237.
12. **Cevinini, R., Sarov, I., Rumpianesi, F., Donati, M., Melega, C., Varotti, C. and La Placa, M.** (1984). Serum Specific IgA Antibody to Chlamydia Infections Detected by ELISA and an Immunofluorescence Test. *J. Clin. Pathol.* 37:686-691.



**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