



SeroELISA™ Chlamydia IgG

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

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č. 111-01)

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

Vyrábí: Savyon Diagnostics Ltd.

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

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Použití

Tento test se používá pro stanovení specifických IgG 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 L₁ - L₃ jsou odpovědný 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 infertility. 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 titer specifických IgG protilátek proti Chlamydii je spolehlivým indikátorem aktivní chlamydiové infekce (3,8).

Vysoké hladiny Anti-chlamydia IgG protilátek se vyskytují u chronických a systemických infekcí jako je salpingitida, mechanická infertilita, perihepatitida, epididymitida, u Reiterova syndromu (3,9,10) a pneumonitidy.

Savyon Diagnostics vyvinul test ELISA pro stanovení specifických IgG protilátek proti Chlamydiím.

Sero ELISA Chlamydia test využívá L₂ 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 přenese 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 IgG (γ-specifický řetězec) protilátkou. Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen-protilátka, HRP značená protilátkou 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 H₂SO₄).
- Absorbance se měří při 450 nm. Výsledkem testu je titer IgG anti-Chlamydia protilátek ve vzorku séra pacienta.

Přehled kroků

1. Chlamydiový Antigen navázaný na pevné fázi (Ag) + Sérum pozitivní na IgG Anti-Chlamydia (Ab₁)
↓
AgAb₁ komplex
2. AgAb₁ komplex + HRP konjugovaný Anti-lidské IgG (Ab₂)
↓
AgAb₁Ab₂ komplex
3. AgAb₁Ab₂ komplex + TMB-Substrát
↓
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 IgG protilátky proti Chlamydiím); v pracovní koncentraci **1 lahvička, 2.0ml**
3. Nízce pozitivní kontrola (lidské sérum nízko pozitivní na IgG protilátky proti Chlamydiím), v pracovní koncentraci **1 lahvička, 2.0ml**
4. Negativní kontrola (lidské sérum negativní na IgG protilátky proti Chlamydiím), v pracovní koncentraci. **1 lahvička, 2.0ml**
5. HRP-konjugát připraven k použití anti-lidské IgG (γ-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 H₂SO₄), 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 µl) 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± 1°C) nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37± 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 dodané materiály musí být uchovávány 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. Nařazený 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 (NaN₃) používáte-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 číré 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 gelovají, 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 IgG.
- 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 promýt 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 pufrům 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: 256 následovně:
1:16 - 10 µl séra pacienta přidejte ke 150 µl ředícího roztoku (Serum Diluent)
1:256 - 10 µl roztoku (ředění 1:16) přidejte ke 150 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 1:256) 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. Promyjte 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.
10. Přikryjte stripy víčkem a inkubujte po dobu 30 min. při 37°C v mlžné komoře.
11. Odstraňte přebytečné množství kapaliny z jamek a proveďte promývací postup popsany v A) celkem 5x.

D) Inkubování s TMB substrátem.

12. Odpipetujte 100 µl substrátu do každé jamky.
13. Přikryjte stripy fólií a inkubujte při laboratorní teplotě 15 min.
14. Reakci ukončete přidáním 100 µl chromogenního stop činidla (1M H₂SO₄) do každé jamky. Chromogenní stop činidlo pipetujte ve stejné sekvenci a stejných časových intervalech jako substrát TMB.
15. 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:

$$\text{COV} = 0,154 \times (\text{Pc} - \text{Nc}) + \text{Nc}$$

Pc = Absorbance pozitivní kontroly při 450 nm

Nc = Absorbance negativní kontroly při 450 nm

Vyhodnocení testu

Absorbance při 450nm	Interpretace výsledku	Titř Chlamydia IgG
pod COV – 0.03	Negativní	<256
COV \pm 0.03	Neurčité*	256
nad COV +0.03 až do slabě pozitivní kontroly	Slabě pozitivní	256-512
Nad slabě pozitivní kontrolou až do pozitivní kontroly	Positivní	1024-2048
Nad pozitivní kontrolou	Silně pozitivní	≥ 2048

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

Význam výsledků

Klinické zkušenosti a moderní studie naznačují, že vysoké hodnoty IgG protilátek proti Chlamydiím jsou významným markrem aktivní nebo chronické chlamydiové infekce.

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 absorpenci 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 (L₂). L₂ 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 IgG s testem IPAzyme Chlamydia IgG/IgA (serologický test pro stanovení protilátek IgG/IgA proti Chlamydiím od f. Savyon Diagnostics (kat.č. 011-01).

Studie zahrnuje jak pacienty s podezřením na chlamydiovou infekci, tak zdravé pacienty (n=328). Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Srovnání SeroELISA™ s IPAzyme™

SeroELISA™ \ IPAzyme™	Positivní	Negativní	Total
Positivní	116	8	124
Negativní	10	194	204
Total	126	202	328

Celková shoda: $(310/328) \times 100 = 94.5\%$

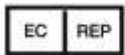
Zkřížená reaktivita

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., Cevenini, 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., Cevenini, 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