



SeroELISA™ Chlamydia TRUE IgM

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

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č. 112-01)

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

Dováží: 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 IgM 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 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 močového (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 matky 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 anti-chlamydia IgM protilátky mají diagnostický význam u pneumonií způsobených *Ch.pneumonií* (TWAR) a *Ch. psittaci* (8). Serologie IgM protilátek u chlamydiových pneumonitid je následující: protilátky se tvoří v časném stádiu infekce s maximem za 1-2 týdny, jejich hladina klesá postupně, za 2-3 měsíce pod detekovatelnou hladinu (11). U 20-50% novorozenců, narozených matkám pozitivním na *Chlamydia trachomatis* a/nebo matkám se zvýšenou hladinou specifických IgG a IgA Chlamydiových protilátek, se vyvinula *chlamydiová pneumonitida* během prvních 6 měsíců života (7).

Protilátky ve třídě IgM jsou přítomné pouze u akutního a nebo nedávného onemocnění. Vyšetření na IgM protilátky se provádí pouze z jednoho vzorku séra a výsledek se uvádí jako přítomnost nebo absence IgM protilátek.

Vysoké titry IgG, současně s titry IgM, mohou být příčinou falešně negativních výsledků ve třídě IgM. Revmatoidní faktor (RF) způsobuje falešně pozitivní výsledky ve třídě IgM (10). Z těchto důvodů, je vysycení RF a IgG, jedním z kroků daného stanovení.

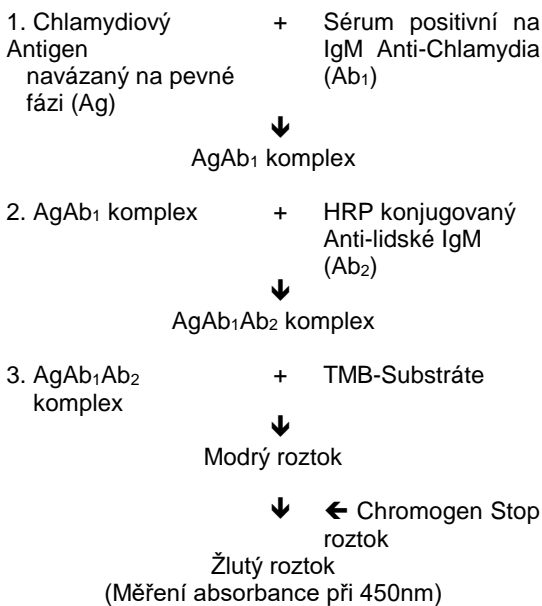
SeroELISA™ Chlamydia test využívá L₂ serovar (široce reaktivní antigen *Ch. trachomatis*), který stanovuje protilátky *Ch.trachomatis*, *Ch.psittaci* a *Ch.pneumoniae* (TWAR).

Princip testu.

- V prvním kroku se lidské sérum 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 IgM (μ-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 H₂SO₄).

- Absorbance se měří při 450nm. Výsledkem testu je titer IgM anti-Chlamydia protilátek ve vzorku séra pacienta.

Přehled kroků



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

- mikrodestička (8x12 jamek v rámečku), 12 stripů, potažená antigenem Chlamydie **1**
- Pozitivní kontrola (lidské sérum pozitivní na IgM protilátky proti Chlamydiím); v pracovní koncentraci **1 lahvička, 2.0ml**
- Negativní kontrola (lidské sérum negativní na IgM protilátky proti Chlamydiím), v pracovní koncentraci **1 lahvička, 2.0ml**
- HRP-Conjugate anti-lidské IgM (μ-řetězec specifický), v pracovní koncentraci. **1 lahvička, 10ml**
- Roztok na ředění vzorků sér, v pracovní koncentraci. **2 lahvička, 60ml**
- Promývací pufr (Concentrated Wash Buffer); 20x koncentrovaný **1 lahvička, 100ml**

- TMB substrát, v pracovní koncentraci **1 lahvička, 16ml**
- Stop roztok (1M H₂SO₄), v pracovní koncentraci **1 lahvička, 16ml**
- fólie na přikrytí destičky **1**
- Návod **1**

Potřebný materiál, nedodávaný v soupravě

- naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta
- vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000 μl) a špičky
- plastové pipety na jedno použití (různých rozměrů) a bezpečnostní pipetovací nástavec
- jednolitrová volumetrická láhev
- 50 ml volumetrický válec
- promývač ELISA destiček nebo promývací nádoba
- filtrační papír
- vortexové míchadlo
- vodní lázeň s víčkem (37± 1°C) nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37± 1°C)
- lednice, 4°C
- reader s filtrem 450 nm pro měření mikrodestiček
- 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 reagensy 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 rozpusťte 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 (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 čiré a nehemolytické vzorky.

Pracovní postup

Poznámky:

- Vždy používejte složky jen z jedné jediné testovací soupravy. Nemíchejte testovací soupravy s různou šarží nebo od jiného výrobce.
- Reagensie 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 IgM.
- 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 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 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 1:105 následovně:
10 µl séra pacienta přidejte do 200 µl ředícího roztoku (Serum Diluent) (1/21), a následně 25 µl tohoto roztoku (1/21) přidejte ke 100 µl ředícího roztoku.
Poznámka: Roztok k ředění sér obsahuje Anti-lidský IgG k odstranění IgG protilátek ze sér.
KONTROLY JSOU V PRACOVNÍ KONCENTRACI! NEŘEĎTE JE !!!
6. Odpipetujte 50 µl pozitivní, negativní kontroly a vzorku séra (ředěného 1:105) 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 50 µl 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 absorpance je možné, ale není nutné. Doba měření absorpance vzorku by neměla přesáhnout 30 min od proběhnutí chromogenní reakce.*

Kritéria testu

Test je validní jestliže:

- absorpance pozitivní kontroly je $\geq 0,8$ při 450 nm
- absorpance 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:

$$COV = 0,24 \times (Pc - Nc) + Nc$$

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

Vyhodnocení testu

Absorpance při 450nm	Výsledek	Interpretace výsledku
Pod COV-0.03	Negativní	Nedetekovatelné IgM Chlamydia protilátky
COV±0.03	Neurčitě	Vzorek séra přetestujte. Pokud znovu dostanete neurčitý výsledek, testování opakujte s dalším odebraným vzorkem.
nad COV + 0.03	Positivní	Jedná se o akutní nebo nedávnou chlamydiovou infekci.

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.
- 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 TRUE-IgM s testem IPAzyme Chlamydia IgG/IgA (serologický test pro stanovení protilátek IgM proti Chlamydiím od f. Savyon Diagnostics (kat.č. 012-01).

Studie zahrnuje jak pacienty s podezřením na chlamydiovou infekci, tak zdravé pacienty (n=162). Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Srovnání SeroELISA™ s IPAzyme™

SeroELISA™ \ IPAzyme™	Positivní	Negativní	Total
Positivní	76	4	80
Negativní	4	78	82
Total	80	82	162

Celková shoda: $(154/162) \times 100 = 95.1\%$

Zkřížená reaktivita

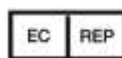
Hospitalizovaní pacienti, infikováni *Neisseria gonorrhoea*, *Staphylococcus aureus* a *Peptostreptococcus anaerobius*, kteří byli diagnostikováni komerčními serologickými testy, byli též testováni kitem SeroELISA Chlamydia. Zkřížená reaktivita nebyla detekovaná.

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., Lunefeld, 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., Yassar, 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., Lunefeld, 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