



Chlamydia IgM SeroFIA™

Immunfluoreszcens vizsgálat a *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* és *C. psittaci* ellen termelődött specifikus IgM antitestek kimutatására emberi szérumból

Használati utasítás

Teszt kit 3 X 105 meghatározáshoz
Katalógus szám: 512-01

In Vitro diagnosztikai használatra.
Csak professzionális felhasználásra
Tárolja 2-8°C-on. **Ne fagyassza.**



Savoyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnositics.com

Használati javaslat

A Chlamydia IgM SeroFIA™ szemikvantitatív immunfluoreszcens vizsgálat a *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* és *C. psittaci* ellen termelődött specifikus IgA antitestek külön meghatározására egyetlen emberi szérum mintából.

In Vitro diagnosztikai használatra.

Bevezetés

A Chlamydia, egy nagyon speciális Gram negatív baktérium, négy speciest tartalmaz: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* (TWAR), *C. psittaci* és *C. pecorum*.

A *C. trachomatis* 15 szerotípusa különböző mértékben hordoz immunológiailag aktív epitópokat. A *C. trachomatis* jelentős szexuálisan átvihető betegség kórokozója, férfiakban nem gonorrhoeás húgycsőgyulladást (NGU) és mellékheregyulladást, nőkben méhnyakgyulladást, húgycsőgyulladást és medencei gyulladásos megbetegedést, HLA-B27 halotípusú egyénekben Reiter-szindrómát, újszülöttekben újszülöttkori kötőhártya-gyulladást és tüdőgyulladást (2-6).

A *C. pneumoniae* fontos légzőszervi patogén emberekben, a közösségben szerzett tüdőgyulladások közel 10%-áért felelős. Összefüggésbe hozható az akut légzőszervi megbetegedésekkel, tüdőgyulladással, asztmával, hörgőgyulladással, torokgyulladással, akut mellkasi szindrómával sarlósejtes megbetegedésben, szívkoszorúér megbetegedéssel és Guillain-Barre szindrómával (7-9).

A *C. psittaci* gazdaszervezetek széles körét képes megbetegíteni, a szúnyogoktól madarakon át az emlősökig, és szintén súlyos tüdőgyulladást okoz.

A szerológiai vizsgálatokat rutinszerűen alkalmazzák a chlamydiák okozta fertőzések diagnosztizálására. Mind a távoli, mind a krónikus chlamydia-fertőzések nem-invazív eszközét jelentik (10, 11), ahol a direkt kimutatási eljárások ritkán eredményesek. Továbbá, bizonyos antitest típusok jelenléte jelezheti a betegség stádiumát is.

Az akut Chlamydia fertőzést 2 – 4 héten belül az IgM dominanciája jellemzi, és az IgG és IgA válasz késleltetve jelenik meg 6 – 8 héten belül. Az akut *C. pneumoniae* fertőzést követően az IgM antitestek 2 – 6 hónap alatt eltűnnek (12), az IgG antitestek titere emelkedik, és rendszerint lassan csökken, míg az IgA antitestek mennyisége gyorsan lecsökken (13).

A Chlamydia újrafertőződést az IgM válasz hiánya, és az azonnali IgG és IgA válasz jellemzi (9). Az IgA antitestek a primer, krónikus és visszatérő fertőzés valódi immunológiai markerei. Ezek az antitestek gyorsan alapértékre csökkennek a kezelés és a chlamydia fertőzés megszűnését követően (1-6, 10, 11).

Emelkedett IgA antitest titereket általában a krónikus fertőzés jelének tekintik (13). Egy tanulmány alapján, amit légzőszervi megbetegedésben szenvedő idős betegeken végeztek, megbecsülték, hogy a *C. pneumoniae* okozta esetek egyötödében nem történt IgA meghatározás (14). Az IgG antitestek hosszú ideig fennmaradnak, és nagyon lassan csökkennek. Ezért az IgG antitestek jelenléte azokat a chlamydia-fertőzéseket jelzi, amelyek valamikor lezajlottak. Azonban, négyszeres, vagy annál magasabb IgG szint fennálló krónikus fertőzést vagy szisztémás fertőzést jelez.

A Savoyon Chlamydia SeroFIA™ teszt egy, a MIF alapelvein alapuló mikro-IF vizsgálat. A SeroFIA™ antigénként tisztított *C. pneumoniae* (TW-183), *C. trachomatis* (L2) és *C. psittaci* (SZ-1) elementáris testeket használ. Minden SeroFIA™ reakció lemez 3 sorban 7 cellát tartalmaz, a sorokban található a *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* vagy *C. psittaci* antigének. A chlamydia-antigének ez az elkülönítése megelőzi a különböző Chlamydia specieszek lehetséges keveredését, és lehetővé teszi az eredmények egyszerű, hibamentes közlését.

A vizsgálat alapelve

- *C. pneumoniae* (C.pn), *C. trachomatis* (C.tr) és *C. psittaci* (C.ps) elementáris testeket (EBS) rögzítettek a SeroFIA™ lemez celláiba, külön-külön a lemez különböző soraiba.
- A hígított páciens szérumokat 90 percig kell inkubálni 37°C-on az adott antigénnek megfelelő sorban.
- A nem kötött szérumalkotókat mosással távolítjuk el.
- Fluoreszcenccel konjugált anti-humán IgM-t adnak hozzá, és inkubálják 30 percig 37°C-on.
- A nem kötött konjugátumot mosással távolítjuk el.
- A lemezeket megszáritjuk, és 3 csepp fedő folyadékkal fedjük le.
- A lemezeket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáljuk. Pozitív reakció esetén világító almazöld EBs jelenik meg a sötét háttér előtt.
- Minőségi meghatározás a szérum egy hígításával végezhető. Szemikvantitatív eredményeket végpont-titrálással kaphatunk.

A kit tartalma

1. **Reakció lemezek (3x7 cella/db):** *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, és *C. psittaci* antigénekkal fedett lemezek, mindegyik külön sorban. Minden lemez szilikagélt tartalmazó alumínium zacskóba csomagolt. **15 darab**



2. **Koncentrált mosó puffer (x20):** PBS-Tween puffer, (pH 7.4-7.6) tartalmaz NaCl-ot, Na_2HPO_4 -t, KH_2PO_4 -t és Tween 20-at.

1 flakon, 100ml

3. **Szérumbígitó:** PBS puffer. Tartalmaz zselatint, bovin szérumbalbumint, MgCl_2 -ot és $<0.1\%$ Na-azidot.

1 flakon, 80ml

4. **Negatív kontroll:** Emberi szérumb, ami negatív *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci* ellen termelődött IgG, IgA, és IgM antitestekre. $<0.1\%$ Na-azidot tartalmaz. Használatra kész.

1 üveg, 0.5 ml

5. ***C. trachomatis* pozitív kontroll:** *C. trachomatis* ellen termelődött IgM antitesteket tartalmazó ember szérumb. $<0.1\%$ Na-azidot tartalmaz. Használatra kész.

1 üveg, 0.2ml

6. ***C. pneumoniae* pozitív kontroll:** *C. pneumoniae* ellen termelődött IgM antitesteket tartalmazó ember szérumb. $<0.1\%$ Na-azidot tartalmaz. Használatra kész.

1 üveg, 0.2ml

7. ***C. psittaci* pozitív kontroll:** *C. psittaci* ellen termelődött IgM antitesteket tartalmazó ember szérumb. $<0.1\%$ Na-azidot tartalmaz. Használatra kész.

1 üveg, 0.2ml

8. **IgG inaktivációs reagens:** anti-human IgG. $<0.1\%$ Na-azidot tartalmaz.

1 flakon, 4ml

9. **FITC-konjugátum:** Fluoreszcinnel jelölt nyúlban termelt anti-human IgM (μ – lánc specifikus). Használatra kész.

1 üveg, 3.3ml

10. **Fedő folyadék:** $<0.1\%$ Na-azidot tartalmaz.

1 cseppentős flakon, 1.5ml

11. **Fedőlemezek:** **1 x 15 db**

12. **Használati utasítás:** **1**

Szükséges, de nem szállított anyagok

1. Tiszta mikrotitráló lemezek vagy csövek a páciens szérumb hígításához.
2. Klinikai centrifuga.
3. Állítható mikropipetták (5-50, 50-200, 200-1000 mikroliteres tartományok) és eldobható hegyek.
4. Térfogatmérő edény (1 liter).
5. Vortex keverő.
6. 37°C vízfürdő fedéllel, vagy egy 37°C áos termosztátba helyezett nedveskamra.
7. Műanyag tálca a lemezek inkubálásához.
8. Desztillált vagy kétszer ioncserélt víz a tömény mosó puffer hígításához.
9. Összenyomható műanyag mosó flakon.
10. Lemeztartó és festőedény.
11. Stopper.
12. Fluoreszcens mikroszkóp FITC fluoreszcencia leolvasásához alkalmas szűrőkkel, és 40x és 100x-os nagyítással.

Figyelmeztetések és előírások

In Vitro diagnosztikai használatra.

1. Ez a kit emberi szérumbot tartalmaz, amit az FDA, CE által javasolt módszerrel bevizsgáltak, és negatív volt HBsAg antigénre és HCV és HIV 1&2 antitestekre. Azonban, mivel egyetlen ismert módszer sem képes teljes biztonságot nyújtani arra vonatkozóan, hogy az emberi vérből készült termék nem fertőző, minden, az ebben a kitben található emberi véralkotót potenciálisan fertőző szérumbnak vagy vérnek kell tekinteni, a CDC/NIH által kiadott "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988 kézikönyv ajánlásainak megfelelően.
2. A chlamydia antigén anyagot, amelyek a lemezeket fedik, inaktiváltak, és nem tartalmaznak élő organizmusokat. Azonban, mivel egyetlen ismert módszer sem képes teljes biztonságot nyújtani arra vonatkozóan, hogy a kórokozó organizmusokból készült termékek nem fertőzőek, a lemezeket úgy kell kezelni és megsemmisíteni, mint potenciálisan veszélyes anyagot, a CDC/NIH által kiadott "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988 kézikönyv ajánlásainak megfelelően.
3. A Na-azidról tudott, hogy robbanó ólom vagy réz azidokat képez a laboratóriumi vízelvezető rendszerben. Ezen alkotók felhalmozódásának megelőzésére a lefolyót és a csövet mossák át nagy mennyiségű vízzel, miután kiöntötték az azidot tartalmazó oldatokat.
4. Ne pipetázzon szájjal.
5. Ne érjen a bőrével a kit egyik reagenséhez sem.
6. Viseljen eldobható kesztyűt, mialatt a szérumbokkal dolgozik, illetve a vizsgálatot végzi. Mossa meg a kezét alaposan, miután levette a kesztyűt.
7. Minden eszközt, folyadékot, vagy egyéb anyagot, ami közvetlen érintkezésbe került az emberi szérumbal, potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni. Sterilizálni, vagy inaktiválni kell ezeket a használat után, mielőtt eldobja vagy tisztítja. Az inaktiválást 121°C -on, legalább egy órán át végzett autoklavozással lehet végezni, vagy 5% végső koncentrációjú Na-hipoklorit oldatos kezeléssel, legalább 30 perces behatási idővel.
8. A FITC-konjugátum Evans Blue-t tartalmaz, ami rákkeltő. Vigyázzon, ne kerüljön a bőrére és szemébe.
9. A fedőanyag korrozív alkotórészeket tartalmaz, vigyázzon, ne kerüljön a bőrére, és ne lélegezze be. Ha a bőrére, vagy a szemébe kerül, mossák ki azonnal nagy mennyiségű vízzel.

A reagensok tárolása és használhatósága

Minden szállított anyagot $2-8^\circ\text{C}$ -on kell tárolni. Ha a reagenset $2-8^\circ\text{C}$ -on tárolja, azok a kit dobozán jelzett lejárati ideig stabilak. Ne használja a kit részeit a lejárati időn túl. Ha a kit alkotórészeit néhány órára szobahőmérsékletnek teszi ki, az még nem okoz károsodást.

Ne tegye ki a reagenset erős fénynek. Ne fagyassza le a reagenset.

Mintavétel és előkészítés

Szérumb vétele

Készítsen standard eljárással szérumbot az aseptikusan levett mintákból. Hővel inaktivált minták nem használhatók. Lipémiás, zavaros vagy szennyezett szérumbok használata nem javasolt. A szérumbban található részecskék vagy kicsapódások hibás

eredményt okozhatnak. Ezeket a mintákat centrifugálással vagy szűrővel meg kell tisztítani a vizsgálat elvégzése előtt.

Tárolás

A mintákat 2-8°C-on kell tárolni és 7 napon belül vizsgálni (0.1% Na-azid hozzáadása erősen javasolt). Ha hosszabb tárolási idő valószínűsíthető, ossza szét a mintákat és tárolja -20°C alatt. Ne olvassa fel és fagyassza le ismételt.

Minta előkészítése

1. Adjon 5µl-t minden páciens szérumból 45µl IgG inaktivációs reagenshez. Keverje össze óvatosan.
2. Minden egyes a fenti módon előkezelt szérumhoz adjon 50µl szérumhígítót. Az ebben a lépésben kapott végső szérumhígítás 1:20.

A végpont titerek meghatározásához készítsen sorozathígítást a szérumhígítóval, kezdje 1:20-szal.

Vizsgálati eljárás

Megjegyzés:

Minden egyes alkalommal, mikor a vizsgálatot végzi, vizsgáljon egy cellában negatív kontrollt, és egy-egy cellában *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* és *C. psittaci* pozitív kontrollt a megfelelő sorban.

Figyelem! A Pozitív Kontroll 1:64 hígításban végpontos titer kontrollként használható!

1. Hagyjon minden alkotórészt és vizsgálni kívánt klinikai mintát szobahőmérsékletűre melegedni.
2. Hígítsa meg a tömény mosó puffert 1:20 arányban, adjon 50ml tömény mosó puffert 950 ml kétszer ioncserélt vagy desztillált vízhez. A hígított puffer 2-8°C-on legfeljebb 2 hétig tárolható.
3. Pipetázzon 10µl-t a kontrollokból és a hígított szérumokból a három sor megfelelő celláiba.
4. Inkubálja a lemezeket nedves kamrában 37°C-on 90 percig.
5. Vegye ki a lemezeket a nedves kamrából, és óvatosan öblítse le a lemezeket a hígított mosó puffer egy-egy sugarával, használja az összenyomható mosó flakont. Mossa a lemezeket úgy, hogy bemelegíti azokat egy hígított mosó puffert tartalmazó festőedénybe. Hagyja bemelegítve 10 percig. Merítse be a mosott lemezeket kétszeresen desztillált vízbe. Vegye ki, és levegőn szárítsa meg.
6. Pipetázzon 10µl FITC-konjugátumot minden egyes cellába.
7. Inkubálja 37°C-on 30 percig.
8. Ismételve meg az 5. pontban leírt öblítést és mosást.
9. Tegye 3 csepp fedőfolyadékot minden egyes lemez közepére. Fedje le a szállított fedőlemezzel. Távolítsa el a levegőbuborékokat azzal, hogy óvatosan lenyomja a fedőlemezt.
10. Olvassa le az eredményeket fluoreszcens mikroszkóppal 400x vagy 1000x hígítással. A legjobb eredmény érdekében a lemezeket a vizsgálat kivitelezésének napján olvassa le. Ha ez nem lehetséges, a lefedett lemezeket sötétben tárolhatja 2-8°C-on legfeljebb 3 napig.

A teszt érvényessége

A teszt érvényességéhez a következő kritériumoknak teljesülniük kell. Ha ezek a kritériumok nem teljesülnek, a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni és meg kell ismételni.

1. A pozitív kontrollok enyhétől erős almazöld fluoreszcenciát mutatnak a megfelelő chlamydia speciesznek megfelelő Chlamydia EB elementáris testek megfestődése miatt.
2. A negatív kontroll nem mutat reakciót (festődést) egyik chlamydia speciessel sem.

Az eredmények értékelése és jelentősége

Javasolt, hogy először a kontroll cellákat olvassa le, hogy biztosítsa a vizsgálati eredmények helyes értékelését. Olvassa le a klinikai minták fluoreszcenciáját és sorolja be a következők szerint:

- + Enyhétől erős, éles vagy diffúz zöldalma színben fluoreszkáló elementáris testek.
- ± Az elementáris testek határozottan, de homályosan fluoreszkálnak. A szérum végpont titerének kell tekinteni. Egy adott szérum végpont titere az az utolsó hígítás, ami még megfigyelhető festődést mutat. A következő hígításnak a negatív szérumnak megfelelő képet kell mutatnia.
- Nincs fluoreszcencia, vagy halvány háttér fluoreszcencia, tiszta chlamydia morfológia nélkül.

Fluoreszcencia megjelenése 1:20 titernél			Értelmezés
C.pn	C.tr	C.ps	

+	-	-	C.pn, C.tr vagy C.ps specifikus IgM antitestek. A $\geq 1:20$ titereket a fertőzés valószínű jelének tekintik.
-	+	-	
-	-	+	

+	+	-	Chlamydia IgM antitestek jelenléte. Többszörös fertőzést, vagy a genus-specifikus determinánsok miatti keresztreakciót jelent.
-	+	+	
+	-	+	
+	+	+	

-	-	-	Negatív. Nincsenek kimutatható C.pn, C.tr, vagy C.ps elleni IgM antitestek.
---	---	---	---

A végpont titerek meghatározása

Ha szemikvantitatív eredményekre van szükség, végpont titrálást kell végezni.

A vizsgálat korlátai

1. Egyetlen szerológiai teszt sem használható a végső diagnózis felállításához. Minden klinikai és laboratóriumi adatot figyelembe kell venni.
2. Azok a minták, amelyeket a primer fertőzéskor túl korán vettek le, lehet, hogy nem tartalmaznak kimutatható antitesteket. Ha chlamydia fertőzésre van gyanú, egy

- második mintát kell venni 2-3 hét múlva, és az eredeti mintával párhuzamosan kell vizsgálni.
- Ha egy szérum több chlamydia speciesszel is reagál, akkor vagy több chlamydia speciesszel fertőződött, vagy az antitestek keresztireagálnak.
 - A mikroszkóp optikája és a fényforrás állapota és típusa befolyásolhatja az átlagos fluoreszcencia intenzitás és a végpont titerek meghatározását.

Teljesítmény jellemzők

A tanulmányt egy független orvosi központban végezték olyan betegeken, akiknél valószínűsíthető volt *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* vagy *C. psittaci* fertőzés.

C. trachomatis eredmények IgM SeroFIA™-val a referens MIF módszerrel összehasonlítva

	MIF	Pozitív	Negatív	Összes
SeroFIA™				
Pozitív		4	0	4
Negatív		1	26	27
Összes		5	26	31

Szenzitivitás: $4/5 \times 100 = 80\%$

Specifitás: $26/26 \times 100 = 100\%$

Átlagos egyezés: $30/31 \times 100 = 96.8\%$

C. pneumoniae eredmények IgM SeroFIA™-val a referens MIF módszerrel összehasonlítva

	MIF	Pozitív	Negatív	Összes
SeroFIA™				
Pozitív		18	4	22
Negatív		1	123	124
Összes		19	127	146

Szenzitivitás: $18/19 \times 100 = 94.7\%$

Specifitás: $123/127 \times 100 = 96.8\%$

Átlagos egyezés: $141/146 \times 100 = 96.6\%$

C. psittaci eredmények IgM SeroFIA™-val a referens MIF módszerrel összehasonlítva

	MIF	Pozitív	Negatív	Total
SeroFIA™				
Pozitív		3	2	5
Negatív		0	26	26
Összes		3	28	31

Szenzitivitás: $3/3 \times 100 = 100\%$

Specifitás: $26/28 \times 100 = 93\%$

Átlagos egyezés: $29/31 \times 100 = 94\%$

Irodalom

- 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.

- 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(2): 130-137.
- Kaneti, J. et al (1988) IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in acute epididymitis. Europ. Urol. 14: 323-327.
- Kletter, Y., Caspi, D., Yarom, M., Sarov, B., Sarov I., and Tanay, A. (1988) Serum IgA and IgG Antibodies Specific to *Chlamydia* in Patients with Reiter's Syndrome (RS) In: Proceedings of The European Society for *Chlamydia* Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, p.170.
- Stutman, H.R., Rettig, P.J. and Reyes, S. (1984) *Chlamydia trachomatis* as a cause of Pneumonitis and pleural effusion. J. Pediatr. 104: 588-591.
- Paran, H., Heimer, D. and Sarov, I. (1986) Serological, clinical and radiological findings in adults with bronchopulmonary infections caused by *Chlamydia trachomatis*. Isr. J. Med. Sci. 22: 823-827.
- Grayston J. T., Campbell, L.A., Kuo, C.C., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D.H. and Wang, S.P. (1990). A new respiratory tract pathogen. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J. Infect. Dis. 161:618-625.
- Hahn D. L., Dodge, R. W. and Golubjatnikow, R. (1991).
- 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.
- Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Holcberg, G., Potashnik, G., Sarov, B. and Insler, V. (1986) Specific IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in infertile women. Int. J. Fertil. 31 (3): 193-197.
- Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984) *Chlamydia pneumoniae* and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
- Grayston, J.T., L.A. Campbell, C.H. Mordhorst, P. Saikku, D. Thom and S.P. Wang. (1989) A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-25
- Saikku, P., M. Leinonen, L. Tenkanen, E. Linnanmaki, M. R. Ekman, V. Manninen, M. Manttari, M.H. Frick, J.K. Huttunen. (1992) Chronic *Chlamydiae pneumoniae* Infection as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.
- Leinonen, M., H. Sryjala, P. Kujala and P. Saikku. (1991). Serological diagnosis of *Chlamydiae pneumoniae* (Cpn) pneumoniae in adults. In: Abstracts of 31st ICAAC, Chicago, Illinois, Sept 29 - Oct 2, 1991. Washington, D.C. Aner. Soc. Microbiol, p.209.

Glossary of Symbols:

Symbols for IVD components and Reagents			
	Manufacturer		In vitro diagnostic medical device
	EU Authorized representative		Consult instructions for use
	Contains Sufficient for <n> tests		Temperature limitation
	Catalogue Code		Use by Date
	Batch Number		CE mark
	Danger		Warning

 0483



European Authorized Representative:
MedNet EC-REP GmbH
Borkstrasse 10,
48163 Muenster, Germany