



Chlamydia IgM SeroFIA™

Imunofluorescenční test na detekci specifických IgM protilátek proti *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* a *C. psittaci* v lidských sérech.

Souprava pro 3 X 105 stanovení
(Katalogové číslo 512-01)

Skladovat při teplotách 2°C až 8°C. **Nezmrazovat.**
Pouze pro **In Vitro** diagnostické použití.
Pouze pro profesionální použití

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 77610

ISRAEL

Tel. +972.8.8562920

Fax. +972.8.8523176

E-mail: support@savondiagnosics.com

Použití

Chlamydia IgM SeroFIA je semikvantitativní imunofluorescenční test pro diferenciální stanovení specifických IgM protilátek proti *C.pneumoniae*, *C.trachomatis* a *C.psittaci* v jediném vzorku lidského séra.

Pro In Vitro diagnostické účely.

Úvod

Chlamydia, rod vysoce specializovaných gram-negativních bakterií, tvoří čtyři druhy: *Ch. trachomatis*, *Ch.pneumoniae* (TWAR), *Ch. psittaci* a *Ch. pecorum*.

Ch. trachomatis je známa v 15 sérotypech, které obsahují v různém stupni imunogenní epitopy.

Ch. trachomatis je nejčastějším původcem sexuální přenosných onemocnění. Je původcem gonokokové uretritidy (NGU) a epididymitis u mužů, cervitidy, uretritidy a zánětů dutiny pánevní u žen, Reiterova syndromu u HLA-B27 haplotypových jedinců a neonatální konjunktivitidy a pneumonie u novorozenců (2-6).

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 (7-9).

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

V mnoha diagnostických laboratořích se v diagnostice chlamydiových infekcí rutinně používá sérologických testů. Sérologické testy slouží jako neinvazivní postupy k identifikaci distálních a chronických chlamydiových infekcí (10,11), kde přímé detekční metody jsou zřídka úspěšné. Navíc, přítomnost určitého typu protilátek může také indikovat stav onemocnění.

Primární chlamydiová infekce je charakteristická predominantní IgM odpovědí za 2-4 týdny a následnou IgG a IgA odpovědí za 6-8 týdnů. Po akutní infekci *Ch. pneumoniae* mizí IgM protilátky obvykle za 2-6 měsíců (12), titry IgG protilátek stoupnou a obvykle pomalu klesají, zatímco IgA protilátky mají tendenci rychle vymizet (13).

Sekundární chlamydiové infekce jsou charakterizovány absencí IgM odpovědi a okamžitou IgG a IgA odpovědí (9). Prokázalo se, že IgA protilátky jsou vhodným imunologickým znakem primární chronické a rekurentní infekce. Tyto protilátky obvykle klesají rychle k základním hladinám v důsledku léčby a eradikace chlamydiové infekce (1-6, 10, 11).

Persistence zvýšených titrů IgA protilátek se obvykle považuje za známku chronické infekce (13). Studie provedená se souborem starších pacientů s respiračními infekcemi prokázala, že pětina infekcí *Ch. pneumoniae* vymizela bez průkazu specifických IgA (14). IgG protilátky persistují dlouho a klesají velmi zvolna. Z toho důvodu přítomnost IgG protilátek indikuje hlavně chlamydiovou infekci v neurčitěm čase. Nicméně čtyřnásobný vzestup IgG specifických protilátek nebo jejich vysoká hladina mohou indikovat nastupující chronickou nebo systémovou infekci.

Savyon Chlamydia IgM SeroFIA™ je mikro-IF test založený na principu MIF. Podobně jako MIF používá SeroFIA™ jako antigen purifikovaná elementární tělíska *Ch. pneumoniae* (TW-183), *C. trachomatis* (L2) a *C. psittaci* (SZ-1). Každé SeroFIA™ reakční skříčka obsahuje tři řady po sedmi jamkách, každá řada obsahuje buď *Ch. pneumoniae*, *Ch. trachomatis* nebo *Ch. psittaci* antigeny. Toto oddělení antigenů zabraňuje možné chybě při diferenciaci druhů, a interpretace výsledků je snadná a bezchybná.

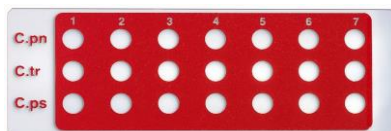
Princip testu

- Purifikovaná elementární tělíska (EBs) *C.pneumoniae* (C.pn), *C.trachomatis* (C.tr) a *C.psittaci* (C.ps) použita jako antigeny, jsou fixována na jamky sklíček, každý druh v jiné řadě jamek sklíčka.
- Naředěná patientská séra se inkubují 90 min. při 37°C v jamkách s odpovídajícími antigeny.
- Promytím se odstraní nenavázané složky séra.
- Aplikuje se fluoresceinem konjugovaný anti-lidský IgM. Inkubace 30min. při 37°C.
- Nenavázaný konjugát se odstraní promytím.
- Následuje sušení skel a montování, přidají se tři kapky montovacího média.
- Sklíčka se prohlíží použitím fluorescenčního mikroskopu. Pozitivní reakce je jasná jablkově zelená fluorescence EBs na tmavém pozadí.
- Pro kvalitativní stanovení je dostatečné jediné ředění séra. Pro semikvantitativní stanovení je nutno použít titraci do konečného ředění.

Souprava obsahuje

1. **Reakční sklička (3x7 jamek):** Sklička jsou kautovaná antigeny *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, a *C. psittaci*, každý v jiné řadě. Každé sklíčko je zabaleno v hliníkovém obalu se silikagelem.

15 x 1



2. **Koncentrovaný promývací pufr (x20):** A PBS-Tween pufr, (pH 7.4-7.6) obsahuje NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ a Tween 20.

1 lahvička, 100ml

3. **Roztok na ředění sér:** A PBS pufr. Obsahuje želatinu, hovězí sérový albumin, MgCl₂ a <0.1% azidu sodného.

1 lahvička, 80ml

4. **Negativní kontrola:** Lidské sérum bez obsahu protilátek IgG, IgA, a IgM k *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*. Obsahuje <0.1% azidu sodného. Neředí se.

1 lahvička, 0.5ml

5. ***C. trachomatis* Positivní kontrola:** Lidské sérum pozitivní na IgM protilátky k *C. trachomatis*. Obsahuje <0.1% azidu sodného. Neředí se.

1 lahvička, 0.2ml

6. ***C. pneumoniae* Positivní kontrola:** Lidské sérum pozitivní na IgM protilátky k *C. pneumoniae*. Obsahuje <0.1% azidu sodného. Neředí se.

1 lahvička, 0.2ml

7. ***C. psittaci* Positivní kontrola:** Lidské sérum pozitivní na IgM protilátky k *C. psittaci*. Obsahuje <0.1% azidu sodného. Neředí se.

1 lahvička, 0.2ml

8. **IgG Inaktivační reagent:** anti-lidský IgG, Obsahuje <0.1% azidu sodného.

1 lahvička, 4ml

9. **FITC-Conjugát:** Fluoresceinem značený králičí anti-lidský IgM (μ – řetězec specifický). Neředí se.

1 lahvička, 3.3ml

10. **Montovací tekutina:** Obsahuje <0.1% azidu sodného.

1 kapací lahvička, 1.5ml

11. **Krycí sklička**

1

12. **Návod k použití**

1

Potřebný materiál, který není součástí soupravy.

1. Čistá mikrotitrační destička nebo zkumavky na ředění sér.
2. Centrifuga
3. Nastavitelné mikropipety (5 – 50, 50 – 200, 200 – 1000 mikrolitrů) a příslušné špičky
4. Odměrný válec na 1 L
5. Vortex třepačka
6. Vodní lázeň 37°C s víkem nebo vlhká komůrka umístěná v termostatu 37°C
7. Plastová miska pro inkubaci sklíček
8. Destilovaná nebo redestilovaná voda na ředění koncentrovaného promývacího pufru
9. Plastová stříčka na promývání
10. Nosič sklíček a barvicí kvyeta
11. Časoměřič
12. Fluorescenční mikroskop s filtry vhodnými pro hodnocení FITC fluorescence se zvětšením 40x až 100x

Upozornění a zásady bezpečnosti

Pouze pro *in vitro* diagnostické použití.

1. Tato souprava obsahuje lidská séra, která byla testována technikami podle FDA, CE. Séra jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HCV a HIV, nicméně, jelikož žádná známá metoda nemůže zaručit s úplnou jistotou, že výrobky derivované z lidské krve nepřenášejí infekci, se všemi komponenty z lidské krve, obsaženými v této soupravě se musí zacházet jako s potenciálně infekčním sérem nebo krví, způsobem identickým (nebo podobným) s doporučením publikovaným v CDC/NIH manuálu „Biobezpečnost mikrobiologických a lékařských laboratoří“, 1988.
2. Chlamydiový antigenní materiál, kterým jsou koutovaná sklička, byl inaktivován a obsah živých organismů je nedetekovatelný. Nicméně, jelikož žádná známá metoda nemůže zaručit s úplnou jistotou, že produkty derivované z patogenních organismů nepřenášejí infekci, se skličky se musí zacházet jako s potenciálním biohazard materiálem, tj. způsobem publikovaným v CDC/NIH manuálu (viz čl. 1).
3. Azid sodný tvoří explozivní azidy olova nebo mědi v potrubí laboratorních odpadů. Aby se předešlo akumulaci těchto sloučenin, laboratorní výlevky se musí promývat velkým objemem vody.
4. Pipetování ústy je nepřipustné.
5. Žádná z reagensů této soupravy nesmí přijít do styku s pokožkou.
6. Při provádění testu a manipulaci se séry je nutné používat ochranné gumové rukavice. Po sejmutí rukavic je nutné pečlivě umýt ruce.
7. Zařízení, tekutiny a předměty, které přišly do přímého styku s lidskými séry, se považují za potenciálně kontaminované. Musí se sterilizovat nebo inaktivovat po použití a před mytím nebo vyřazením po použití. Inaktivace může být provedena buď autoklávováním při 121°C nejméně 1 h nebo vystavením účinku roztoku chlornanu sodného v 5% finální koncentraci (po dobu nejméně 30 min.)
8. FITC – konjugát obsahuje Evansovu modř, která je kancerogenní. Roztok nesmí přijít do styku s pokožkou a očima.
9. Montovací medium obsahuje korozivní látky. Nesmí přijít do styku s pokožkou a nesmí dojít k jeho inhalaci. V případě kontaktu s pokožkou a očima je nutné provést okamžitý oplach (výplach) nadbytkem vody.

Uchovávání a trvanlivost reagensů

Všechny dodávané materiály je nutno skladovat při teplotě 2 až 8°C. Reagencie, uchovávané při teplotě 2 až 8°C, jsou stabilní do data expirace, vyznačeného na obalu soupravy. Nepoužívejte složky soupravy po datu expirace.

Expozice složek soupravy obvyčejné teplotě po dobu několika hodin nezpůsobí zničení reagensů.

Nevystavujte reagencie silnému světlu.

Reagencie nezmrazujte.

Odběr vzorků a příprava vzorků

Odběr vzorků

Vzorky sér se odebírají asepticky standardními technikami. Tepelně inaktivovaná séra nemohou být použita. Nedoporučuje se použití lipemických, zakalených a kontaminovaných sér.

Drobné částice a sraženiny v séru mohou způsobovat chybné výsledky. Tyto vzorky by měly být před stanovením vyčefeny centrifugací nebo filtrací.

Skladování

Vzorky by se měly skladovat při teplotě 2-8°C pokud jsou testovány během 7 dní (doporučuje se přidavek 0,1% azidu sodného). Pro delší uchování je nutno alikvoty séra uchovávat při teplotě -20°C. Vyhněte se opakovanému mrazení a rozmrazování séra.

Příprava vzorků

1. Do 45µl IgG inaktivačního reagentu přidejte 5 µl séra pacienta. Důkladně promíchejte.
2. Do takto získaných 50 µl předpřipraveného séra přidejte 50 µl roztoku k ředění séra. Konečné ředění je 1:20.

Pro stanovení titrů („endpoint“ titrace) se séra ředí (počínaje od ředění 1:20) ředící dvojkovou řadou.

Pracovní postup

Poznámka: Součástí každého běhu by měla být jedna jamka s negativní a jedna jamka s pozitivní kontrolou pro Ch.pneumoniae, Ch. trachomatis a Ch.psittaci, vždy na odpovídajícím řádku.

Positivní kontroly v poměru 1:64 odpovídá hladina kontroly titru end-point.

1. Před zahájením testu se sklíčka, reagentie a patientská séra nechají vytemperovat při laboratorní teplotě.
2. Koncentrovaný promývací pufr se ředí v poměru 1:20 přidáním 50 ml koncentrovaného promývacího pufru do 950 ml deionizované nebo destilované vody. Naředěný pufr se může uchovávat při teplotě 2 až 8°C nejvýše po dobu dvou týdnů.
3. Do příslušných jamek každé ze tří řad se pipetuje 10 µl kontrol nebo ředěného séra.
4. Sklíčka se inkubují ve vlhké komůrce při 37°C po dobu 90 minut.
5. Sklíčka se vyjmou z vlhké komůrky a každé sklíčko se jemně opláchne proudem naředěného promývacího pufru pomocí stříčky. Sklíčka se promyjí ponořením do kyvety osahující promývací pufr. Po 10 min se vyjmou, ponoří do destilované vody, vyjmou a ponechají na vzduchu vyschnout.
6. Do každé jamky se pipetuje 10 µl FITC konjugátu.
7. Inkubuje se při teplotě 37°C po dobu 30 minut.
8. Opláchnutí a promytí skel se opakuje podle kroku 5.
9. Podél středu každého sklíčka se kápnou 3 kapky montovacího roztoku. Jamky se překryjí krycím sklem. Případné vzduchové bubliny se odstraní jemným tlakem na krycí sklíčko.
10. Výsledky se hodnotí pomocí fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 400x až 1000x. Nejlepší výsledky dává hodnocení preparátů v den jejich přípravy. Jestliže to není možné, zamontované preparáty se mohou skladovat ve tmě při 2 – 8°C po dobu nejvýše tří dnů.

Validita testu

Aby byl test platný, musí být splněna následující kritéria. Jestliže kontroly nemají výše uvedené charakteristiky, test se považuje za neplatný a musí být zopakován.

Pozitivní kontroly vykazují střední až intenzivní jablkově zelenou fluorescenci partikulí elementárních tělísek chlamydií podle příslušného druhu.

Negativní kontrola vykazuje zanedbatelnou reaktivitu (barvení) s každým z druhů chlamydií.

Interpretace a význam výsledků

Doporučuje se hodnotit jako prvé kontrolní jamky, aby se zajistila správná interpretace výsledků. Fluorescence klinických vzorků se hodnotí následujícím způsobem:

- + Střední až intenzivní, ostrá nebo difuzní jablkově zelená fluorescence elementárních tělísek.
- ± Fluorescence elementárních tělísek je zřetelná, ale tlumená. Považuje se za „endpoint“ titru séra. Titr daného séra je definován jako nejvyšší ředění, které ještě vykazuje zřetelnou fluorescenci. Další ředění má vykazovat fluorescenci jako negativní sérum.
- Bez fluorescence nebo se slabou fluorescencí pozadí bez zřetelné morfologie chlamydií.

Fluorescence při titru 1:20			Interpretace
C.pn	C.tr	C.ps	

+	-	-	Přítomnost specifických IgM k druhům C.pn, C.tr, nebo C.ps. Titr ≥ 1:20 se pokládá za pravděpodobný průkaz infekce.
-	+	-	
-	-	+	

+	+	-	Přítomnost IgM protilátek k chlamydiím. Vysvětlením je infekce více druhů nebo mezidruhově zkřížené reakce. Pro odlišení predominantního druhu je nutno provést endpoint titraci.
-	+	+	
+	-	+	
+	+	+	

-	-	-	Negativní. IgM protilátky proti C.pn, C.tr, C.ps nedetekovatelné.
---	---	---	---

Význam end-point titrace

Endpoint titrace se provádí, jestliže vyžadujeme semikvantitativní výsledky.

Omezení testu

1. Konečná diagnóza nemůže být určena na základě výsledku jediného sérologického testu – v úvahu se musí brát všechny klinické a laboratorní údaje.

2. Vzorky odebrané příliš brzy v průběhu primární infekce nemusejí obsahovat detekovatelné protilátky. Jestliže chlamydiová infekce je suspektní, je nutno vyšetřit (paralelně s prvním sérem) druhý vzorek séra, odebraného o 14 -21 dní později.
3. Reaktivita séra s více druhy chlamydií může být způsobena expozicí více než jednomu druhu nebo přítomností křížově reagujících protilátek.
4. Optika mikroskopu a podmínky světelného zdroje a jeho typ mohou ovlivnit intenzitu fluorescence a výšku titru.

Charakteristika účinnosti

Studie byla provedena v nezávislém lékařském zařízení. Byla použita séra suspektních pacientů infikovaných *C.trachomatis*, *C. pneumoniae* nebo *C. psittaci*.

Srovnání výsledků *Chlamydia trachomatis* IgM SeroFIA™ s MIF.

MIF \ SeroFIA™	Positivní	Negat.	Celk.I
Positivní	4	0	4
Negativní	1	26	27
Celkem	5	26	31

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

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

Celková shoda s MIF: $30/31 \times 100 = 96.8\%$

Srovnání výsledků *Chlamydia pneumoniae* IgM SeroFIA™ s MIF.

MIF \ SeroFIA™	Positivní	Negat.	Celk.
Positivní	18	4	22
Negativní	1	123	124
Celkem	19	127	146

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

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

Celková shoda s MIF: $141/146 \times 100 = 96.6\%$

Srovnání výsledků *Chlamydia psittaci* IgM SeroFIA™ s MIF.

MIF \ SeroFIA™	Positivní	Negat.	Celk.
Positivní	3	2	5
Negativní	0	26	26
Celk.	3	28	31

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

Specifická: $26/28 \times 100 = 93\%$

Celková shoda s MIF: $29/31 \times 100 = 94\%$

- salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. Eur. J. Epidemiol. 1: 110-116.
2. 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.
3. Kaneti, J. et al (1988) IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in acute epididymitis. Europ. Urol. 14: 323-327.
4. 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 Rieter's Syndrome (RS) In: Proceedings of The European Society for *Chlamydia* Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, p.170.
5. Stutman, H.R., Rettig, P.J. and Reyes, S. (1984) *Chlamydia trachomatis* as a cause of Pneumonitis and pleural effusion. J. Pediat. 104: 588-591.
6. Paran, H., Heimer, D. and Sarov, I. (1986) Serological, clinical and radiological findings in adults with broncho- pulmonary infections caused by *Chlamydia trachomatis*. Isr. J.Med. Sci. 22: 823-827.
7. 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.
8. Hahn D. L., Dodge, R. W. and Golubjatnikow, R. (1991). Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. JAMA 266: 225-230
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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
13. 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.
14. 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. Amer. Soc. Microbiol, p.209.

Literatura

1. Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V. (1985) Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in

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



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