



SeroCP™ IgM

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

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č. A192-01)

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 77610
ISRAEL
Tel. +972.8.8562920
Fax. +972.8.8523176
E-mail: support@savondiagnostics.com

Použití

SeroCP™ IgM se používá pro stanovení IgM protilátek specifických proti *Chlamydii pneumoniae* v lidském séru. Toto stanovení IgM protilátek, umožňuje časnou diagnózu probíhající infekce z jednoho vzorku séra.

Pouze pro in vitro diagnostické stanovení.

Úvod

Chlamydia pneumoniae (TWAR183) je nově objevený infekční činitel s rozsáhlými klinickými projevy zahrnující infekci horních a dolních cest dýchacích (1). Většina infekcí způsobených *Ch. pneumoniae* je mírná, asymptomatická a proto též špatně detekovatelná. *Ch. pneumoniae* může způsobovat mnoho onemocnění jako je např.: faryngitida, sinusitida, akutní bronchitida a společné pneumonie. Nedetekované a neléčené infekce mohou být příčinou dlouhých persistentních onemocnění. Nedávno získaná data naznačují souvislost mezi *Ch. pneumoniae* a chronickým onemocněním (2).

Prevalence *Ch. pneumoniae* mezi dětmi je nízká a prudce se zvyšuje v dospívání, pokračuje zvýšením ve středním věku a ve vysoké hodnotě přetrvává (>50%) do staršího věku.

Potíže spojené s odběrem vzorků a určením místa infekce dělají z přímých metod metody špatně proveditelné a proto se stále více používají metody nepřímé, kde se protilátky stanovují ze séra pacienta. Serologické testy slouží jako

neinvasivní nástroj při určování distálních a chronických infekcí (3), kde přímé metody nejsou dostatečně citlivé (4). Kromě toho přítomnost určitých typů protilátek může také stanovit stádium onemocnění.

Primární chlamydiová infekce je charakterizována převládající imunitní odpovědí IgM během 2-4 týdnů a s následnou imunitní odpovědí IgA a IgG protilátek během 6-8 týdnů. Po proběhnutí akutní chlamydiové infekce vymizí IgM protilátky během 2-6 měsíců (5), titry IgG protilátek se zvyšují a obvykle se snižují pomalu; kdežto IgA protilátky mizí rychleji (6). Pokud se předpokládá primární chlamydiová infekce má detekce IgM protilátek vysoký diagnostický význam (7). Nicméně jejich nepřítomnost nevylučuje možnost pokračující infekce hlavně při opakovaných nebo chronických případech.

Při reinfekci, IgA a IgG protilátky stoupají rychle, často v rozmezí jednoho až dvou týdnů (8).

IgA protilátky se projevily jako účinný imunologický marker primární, chronické nebo opakující se infekce. Tyto protilátky obvykle rychle klesají na základní hladinu po následném léčení a odeznění chlamydiové infekce (3). Přetrvání zvýšené hodnoty IgA protilátek je hlavně považováno jako znak chronické infekce (6).

IgG protilátky přetrvávají po dlouhou dobu a klesají velmi pozvolna. Proto je přítomnost IgG protilátek hlavním znakem chlamydiové infekce v neurčitěm čase. Jakékoli zvýšení hodnot IgG protilátek může určovat přicházející chronickou nebo systemickou infekci.

Savyon Diagnostics vyvinul ELISA test, v které se používají purifikované elementární tělíska *Ch. pneumoniae* (TW-183) jako antigeny pro stanovení protilátkové odpovědi u lidí. Pro kompletní diagnózu probíhající, chronické nebo proběhlé infekce se doporučuje stanovení IgA, IgM a IgG protilátek proti *Ch. pneumoniae*.

Princip testu

- SeroCP™ Jamky destičky jsou pokryty purifikovanými elementárními tělíska antigenu *C. pneumoniae* (TWAR - 183).
- Testované sérum je naředěno a inkubováno v SeroCP™ destičce po dobu 1h při 37°C. V tomto kroku se protilátky *C. pneumoniae* vážou na imobilizované antigeny.
- Nespecifické protilátky se odstraní promytím.
- Přidají se anti-lidské IgM konjugované HRP. Inkubuje se po dobu 1h při 37°C. V tomto kroku se HRP konjugát naváže na dříve vzniklý komplex antigen-protilátka.
- Nenavázaný konjugát se odstraní promytím.
- Po přidání substrátu, se substrát hydrolyzuje peroxidázou za vzniku žlutě zabarveného roztoku.
- Po přidání stop roztoku se zabarvení přemění na žluté, jehož intenzita se mění na ELISA readeru při vlnové délce 450 nm.
- Absorbance je proporcionálně úměrná množství specifických protilátek obsažených v testovaném séru.

Postup stanovení

Přidejte 2x50 μ l Negativní kontroly, 1x50 μ l Positivní kontroly a naředěných vzorků do jamek mikrotitrační destičky, které jsou potaženy antigeny *C. pneumoniae*

↓
Destičku přikryjte a inkubujte 1 h při 37°C ve 100% vlhkosti

↓
3x promyjte promývacím pufr

↓
Přidejte 50 μ l HRP konjugátu naředěného v poměru 1/300

↓
Destičku přikryjte a inkubujte 1 h při 37°C ve 100% vlhkosti

↓
3x promyjte promývacím pufr

↓
Přidejte 100 μ l TMB-Substrátu

↓
Destičku přikryjte a inkubujte 15min při laboratorní teplotě

↓
Přidejte 100 μ l Stop roztoku

↓
Absorbanci odečtěte při 450nm

↓
Vypočítejte a interpretejte výsledky

Souprava obsahuje

Kit pro 96 stanovení

Kat.číslo: A192-01

1. **mikrodestička** potažená antigeny *Chlamydia pneumoniae*; 96 jednotlivě odlamovatelných jamek (8x12); uložené v hliníkové fólii se sušidlem

1 Destička

2. **koncentrovaný promývací pufr (20x)**: A PBS-Tween ufr

1 lahvička, 100ml

3. **IgM ředící roztok k ředění sér (červený)** – anti-lidské IgG v roztoku, obsahuje méně než 0,05% proclinu jako koncentrační prostředek; v pracovní koncentraci

2 lahvička, 60ml

4. **ředící roztok k ředění konjugátu (zelený)** - obsahuje méně než 0,05% proclinu jako koncentrační prostředek; v pracovní koncentraci

2 lahvička, 20ml

5. **negativní kontrola** lidské sérum negativní na IgM protilátky proti *Chlamydia pneumoniae*, obsahuje méně než 0,05% proclinu a 0,1% azidu sodného jako koncentrační prostředek; v pracovní koncentraci

1 lahvička, 2,5ml

6. **pozitivní kontrola** lidské sérum pozitivní na IgM protilátky proti *Chlamydia pneumoniae*, obsahuje méně než 0,05% proclinu a 0,1% azidu jako koncentrační prostředek; v pracovní koncentraci

1 lahvička, 2ml

7. **HRP koncentrovaný konjugát (300x)** Conjugated Anti-Human IgM (μ -specifické řetězce;); obsahuje méně než 0,05% proclinu jako koncentrační prostředek

1 lahvička, 0,2ml

8. **TMB substrátu**, roztok obsahuje 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin jako chromogen a peroxid jako substrát; v pracovní koncentraci

1 lahvička, 16ml

9. **stop činidlo** (Stop Solution); roztok obsahuje 1 M H₂SO₄; v pracovní koncentraci

1 lahvička, 16ml

11. **manuál**

1

Potřebný materiál (nedodávaný v soupravě).

1. naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta
2. plastové zkumavky na jedno použití pro ředění HRP konjugátu
3. vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000 μ l) a špičky
4. jednolitrová volumetrická láhev
5. 50 ml volumetrický válec
6. promývač ELISA destiček nebo promývací nádoba
7. absorpční papír
8. vortexové míchadlo
9. vodní lázeň (37°C) s poklopem nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37°C)
10. reader s filtrem 450 nm pro měření mikrodestiček
11. destilovaná nebo dvakrát deionizovaná voda

Upozornění

Pouze pro *in-vitro* diagnostické použití!

1. Složky lidského séra v testovacích soupravách jsou testovány metodami schválenými FDA a neobsahují povrchový antigen HBV a protilátku k viru HIV a HCV. Poněvadž nejsou známy metody, které by kompletně zajišťovaly, že produkty pocházející z lidské krve nejsou infekční, musí být se všemi složkami krve dodávanými v těchto soupravách zacházeno jako s možným infekčním materiálem a ve shodě s doporučeními uvedenými v CDC/NIH manuálu (Biosafety Biological and Biomedical Laboratories, 1988).
2. Roztok TMB- substrátu působí dráždivě na pokožku a mukózní membrány. Vyvarujte se přímého kontaktu.
3. Všechny součásti této soupravy jsou kalibrovány a testovány při sériové výrobě. Nedoporučuje se míchat složky z různých šarží; mohou ovlivnit výsledek testu.
4. Roztok 1 M kyseliny sírové působí dráždivě na oči a kůži. V případě zasažení očí okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc. Nevlévejte vodu do tohoto roztoku. V případě nehody vyhledejte lékaře a ukažte mu nálepku na lahvi.

Uchovávání a trvanlivost reagensů.

1. 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, k poškození reagensů nedojde. **NEMRAZTE !!!**
2. Trvanlivost otevřené soupravy je 90 dní ode dne otevření.
3. Nepoužité stripy vložte zpět do hliníkové folie, přidejte balíček se sušidlem a zalepte lepicí páskou.

4. Při uchovávání 20x koncentrovaného roztoku promývacího pufru v chladu se mohou tvořit krystalky. Ty odstraníte zahřáním pufru při teplotě 37°C těsně před použitím. Zředěné roztoky by měly být uchovávány při teplotě 2-8°C, nejdéle však 21 dní.

Odběr vzorku.

Pro odběr vzorku by měly být používány standardní metody. Neměla by být používána tepelně upravená séra. Zakalené vzorky nebo vzorky s hemolytickým sérem mohou způsobovat chybné výsledky. Před použitím nejdříve vzorky vyčistíte centrifugací nebo filtrací.

Uchování

Vzorky sér by měly být uchovávány při teplotě 2-8°C a použity na testování během 7 dní; doporučuje se je skladovat s roztokem 0,1% azidu sodného (NaN₃), jsou-li vzorky používány po dobu několika dní. Pro delší dobu použití uchovávejte potřebné množství séra při -20°C. Vyvarujte se častému rozmrazování a následnému mražení.

Pracovní postup

A. Příprava reagensií.

1. Všechny testovací reagensie před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte vzorky, pozitivní a negativní kontroly.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuto měření dvou negativních a jedné pozitivní kontroly
3. Vyjměte mikrodestičku z hliníkové folie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných vzorků) z 96 jamkového rámečku.
4. Zřeďte 1/20 koncentrovaný promývací pufr dvakrát-deionizovanou nebo destilovanou vodou. Pro příklad: pro přípravu 1 L promývacího pufru přidejte k 50 ml koncentrovaného roztoku promývacího pufru 950 ml dvakrát deionizované nebo destilované vody.

B. Inkubace vzorků sér a kontrol.

5. **Jednokrokové ředění:** nařeďte každý vzorek pacienta v poměru 1/105 následovně: přidejte 5μl séra pacienta k 520μl roztoku pro ředění sér. **Dvou-krokové ředění:** Zřeďte každý vzorek séra 1/105 dodávaným ředícím roztokem následovně: 10μl séra pacienta přidejte k 200μl roztoku k ředění sér (1/21), následně přidejte 25μl takto získaného roztoku ke 100μl roztoku k ředění sér.
Poznámka: Roztok k ředění sér obsahuje anti-lidský IgG, k odstranění IgG protilátek z lidského séra.
6. Pipetujte 50μl pozitivní kontroly, negativní kontroly a sér naředěných v poměru 1/105 do příslušných jamek na stripu. **Negativní kontrola se dává do dvou jamek.**
7. Přikryjte strip víčkem a dejte inkubovat na 1 hodinu do mlžné komory (37°C).
8. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek.

9. **Promývací krok:** naplňte každou jamku promývacím pufr (300-350μl) po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 3x.
10. Osušte stripy a rámeček jemným poklepáním na absorpčním papíru.

C. Inkubace s konjugátem.

11. Koncentrovaný roztok HRP-konjugátu zřeďte do pracovní koncentrace těsně před použitím v poměru 1/300 roztokem Conjugate Diluent. Např. pro dva stripy připravte minimálně 3 ml zředěného HRP-konjugátu následovně: 10 μl koncentrovaného roztoku HRP-konjugate a smíchejte s 3 ml roztoku Conjugate Diluent.
12. Odpipetujte 50 μl zředěného konjugátu do každé z jamek.
13. Přikryjte strip víčkem a inkubujte 1 hodinu při 37°C v mlžné komoře.
14. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek a proveďte promývací krok, jak je uvedeno v bodě 9-10.

D. Inkubování s TMB-substrátem.

15. Odpipetujte 100 μl roztoku TMB-Substrate do každé z jamek, přikryjte víčkem a inkubujte při laboratorní teplotě **15 min.**
16. Reakci ukončete přidáním 100 μl roztoku Stop Solution (1 M H₂SO₄) do každé z jamek.

E. Odečtení výsledků.

17. Proměřte absorbanci při 450 nm a výsledek zapište. Odečtení může být provedeno do 30 min od zastavení chromogenní reakce.

Pozn.: Před odečtením nesmí jamka obsahovat žádné bublinky. Dno destičky musí být opatrně očištěno.

Validita testu

Test je validní, jestliže jsou splněna následující kritéria: Pokud nejsou splněny tyto podmínky, není test validní a musí být zopakován.

1. **Pozitivní kontrola:** Hodnota absorbance musí být: ≥0,8 při 450 nm
2. **Negativní kontrola:** Průměrná hodnota absorbance negativních kontrol musí být 0,1 < NC ≤ 0,4 při 450 nm

Výpočet Cut Off hodnoty (COV) a Cut Off Indexu (COI)

Cut-off hodnota se vypočítá následovně:

$$COV = NC \times 2$$

NC = Střední absorbance negativní kontroly, která se měří duplicitně

Aby se normalizovaly výsledky získané z různých testů, počítá se cut-off index podle následujícího vzorce:

$$COI = \frac{\text{Absorbance vzorku séra při 450nm}}{COV}$$

Interpretace výsledků

Asorbance (450nm)	COI	Výsledek	Diagnostická interpretace
O.D < 1.4xCOV	<1.4	Negativní IgM protilátky nebyly detekované	Žádné náznaky probíhající infekce Ch.pneumonie
1.4COV ≤ O.D ≤ 1.5xCOV	1.4-1.5	Hraniční Nízká hladina IgM protilátek	Možné náznaky expozice C.pneumonie. Doporučuje se otestovat druhý vzorek za 2-4 týdny ¹
O.D > 1.5 x COV	>1.5	Positive relevantní hladina IgM protilátek	Indikace probíhající infekce C.pneumonie

V případě hraničních výsledků testujeme druhý vzorek, ten by měl být odebrán za 2-4 týdny a testován současně s prvním. Pokud se opět naměří hraniční výsledek, vzorek se považuje za negativní.

Abychom dosáhli kompletního protilátkového profilu je třeba testovat i IgG a IgA protilátky

Interpretace výsledků založená na kombinaci IgG, IgA a IgM protilátek.

Hladiny <i>C.pneumoniae</i> protilátek			Interpretace výsledků
IgM	IgG	IgA	
Negativní	Negativní	Negativní	Žádné náznaky infekce <i>C. pneumoniae</i>
Positivní	Negativní nebo pozitivní	Negativní nebo pozitivní	Indikuje současnou infekci
Negativní	Positivní	Negativní	Indikuje proběhlou nebo současnou infekci
Negativní	Positivní nebo negativní	Positivní	Indikuje probíhající nebo chronickou infekci

Omezení testu

- Ke stanovení konečné diagnózy nestačí pouze jeden serologický test. V potaz se musí vzít klinická historie pacienta.
- Vzorky, které byly odebrány příliš brzo během primární infekce nemusí obsahovat detekovatelné množství protilátek. Pokud je podezření na chlamydiovou infekci, měl by se během 2-4 týdnů odebrat další vzorek na analýzu. Ten by se měl testovat paralelně s prvním vzorkem.

Chování testu

Srovnáváním SeroCP™ IgM

microimunofluorescenčním testem (MIF), také od Savyonu

Studie byla provedena ve 2 lékařských centrech na 113 vzorcích; séra symptomatických pacientů (33) a 80 vzorcích zdravých dětí.

MIF SeroCP™	Positivní	Negativní	Celkem
Positivní	30	4	34
Negativní	3	76	79
Celkem	33	80	113

Sensitivita 30/33 x 100 = 91%

Specifická 76/80 x 100 = 95%

Celková shoda: 106/113 x 100 = 94%

Přesnost

Intra-assay (uvnitř běhu)

Vzorek	Počet opakování	Střední hodnota	CV%
Positivní	10	1.469	2,3
Negativní	10	0.236	4,7

Inter-assay (mezi běhy)

Vzorek	Počet opakování	Střední hodnota	CV%
Positivní	10	0,605	5,4
Negativní	10	0,163	6,0

Literatura

- Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
- Saikk, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann. Intern. Med. 116: 273-278.
- Puolakkainen, M., Saikk, 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.
- Campbell, L.A. (1993). PCR detection of *Chlamydia pneumoniae* In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
- Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic

evolution of serum *chlamydia* antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.

6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinon, M., Eckman, 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 Infarction. Lancet. 2: 983-986.
7. Grayston, J.T., Cambell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-625.
8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Mannin, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.



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



Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL
Tel.: +(972).8.8562920
Fax: +(972).8.8523176
E-mail: support@savyondiagnostics.com

Symbols for IVD components and Reagents	
	Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Manufacturer
	Store at 2°C – 8°C
	Expiry Date
	Warning
	Danger
	Contains Sufficient for 96 tests
	Consult Instructions for Use
	CE mark
	EU Authorized representative
	Batch Number