



SeroCP™ IgM

ELISA vizsgálat a *Chlamydia pneumoniae* ellen termelődött IgM antitestek kimutatására emberi szérumból.

Használati utasítás

Teszt kit 96 meghatározáshoz
(Kat. szám: A192-01M)

In vitro diagnosztikai használatra.
Csak professzionális felhasználásra
Tárolja 2-8°C-on. **NE FAGYASSZA!**

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Használati javaslat

SeroCP™ IgM kit egy ELISA vizsgálat a *Chlamydia pneumoniae* ellen termelődött specifikus IgM antitestek emberi szérumból történő kimutatására.

A teszt lehetővé teszi az akut fertőzés diagnosztizálását egyetlen szérum mintából az IgM antitestek kimutatásával.

In vitro diagnosztikai használatra.

Bevezetés

A *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) egy kimutatható fertőző ágens, melynek klinikai manifesztációja többféle lehet, beleértve a felső és alsó légzőtraktus fertőzéseit (1). A *C. pneumoniae* fertőzések jellegzetessége, hogy enyhék és tünetmentesek, de ennek ellenére komoly megbetegedéseket is képes okozni, mint pl. torokgyulladás, orrmelléküreggyulladás, akut hörgőgyulladás és közösségben szerzett tüdőgyulladás. A ki nem mutatott és nem kezelt fertőzések elhúzódó és állandó betegséghez vezethetnek. A jelenlegi adatok azt mutatják, hogy lehetséges kapcsolat van a *C. pneumoniae* fertőzések és a krónikus betegségek között (2).

A *C. pneumoniae* szeroprevalenciája gyermekek között alacsony, majd erősen emelkedik középkorúakig, és magas marad idős korig (> 50%).

A mintavétel és a fertőzött terület megközelítésének nehézségei komolyan hozzájárulnak a direkt kimutatási eljárások sikertelenségéhez. Ezért a szerológiai vizsgálatokat használják rutinszerűen, és ez szolgál a távoli és krónikus chlamydia-fertőzések azonosításának nem invazív

eszközeként is (3), ahol a direkt kimutatási eljárások ritkán sikerülnek (4). Ezen kívül bizonyos antitestek jelenléte jelezhetik a betegség stádiumát is.

A friss chlamydia fertőzést az IgM válasz dominanciája jellemzi 2 – 4 héten belül, és késleltetve az IgG és IgA válasz 6 – 8 héten belül. Az akut *C. pneumoniae* fertőzést követően az IgM antitestek rendszerint 2 – 6 hónapon belül eltűnnek (5), az IgG antitestek titere rendszerint lassan csökken; míg az IgA antitestek gyorsan eltűnnek (6). Ha friss chlamydia fertőzésre van gyanú, az IgM kimutatásának van magas diagnosztikus értéke (7). Azonban visszatérő vagy krónikus fertőzésben az IgM prevalenciája alacsony, és ezért az IgM hiánya nem alkalmas a fennálló fertőzés kizárására. Újrafertőzésben az IgG és IgA szintek gyorsan emelkednek, gyakran 1 – 2 héten belül (8). Az IgA antitestek a friss, krónikus és visszatérő fertőzések valós immunológiai markere. Ezek az antitestek a kezelést és a chlamydia fertőzés megszűnését követően rendszerint gyorsan visszatérnek a normál szintre (3). Fennmaradó magas IgA antitesteket a krónikus fertőzés jelének tekintik (6).

Az IgG antitestek hosszú ideig megmaradnak, és nagyon lassan csökkennek. Ezért az IgG antitestek jelenléte valamikor lezajlott chlamydia fertőzést jelezhet. Azonban a négyeszeresre, vagy ennél magasabbra emelkedett IgG antitest szintek fennálló krónikus fertőzést jelezhetnek.

A SeroCP™ egy ELISA alapú vizsgálat, ami tisztított *C. pneumoniae* elemi testeket (TWAR-183) tartalmaz antigénként, az emberekben kialakult antitest válasz kimutatására. Az aktuális, krónikus vagy lezajlott fertőzések tökéletes kimutatására javasolt a *C. pneumoniae* ellen termelődött IgG, IgM és IgA antitestek kimutatása.

A vizsgálat alapelve

- A SeroCP™ lemezeket tisztított *C. pneumoniae* elemi testekkel (TWAR-183) fedetten szállítják.
- A vizsgálni kívánt szérumot meghígítva 1 órán át kell inkubálni SeroCP™ lemezben 37°C-on. Ebben a lépésben a *C. pneumoniae* antitestek leköti az immobilizált antigénekhez.
- A nem specifikus antigéneket mosással távolítjuk el.
- Tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-humán IgM-t kell a rendszerhez adni, és inkubálni 1 órán át 37°C-on. Ebben a lépésben a HRP-konjugátum megkötődik az előzőleg leköti antigén-antitest komplexhez.
- A nem kötött konjugátumot mosással távolítjuk el.
- A TMB-szubsztrát hozzáadását követően a peroxidáz bontja a szubsztrátot, aminek eredményeképpen a hasított szubsztrátból kék oldat keletkezik.
- A leállító (stop) oldat hozzáadása után a kék szín sárgára változik, és le kell mérni az ELISA leolvasóval 450nm-es hullámhosszon.
- Az abszorbancia arányos a fedett antigénekhez kötődött specifikus antitestek mennyiségével.

Vizsgálati eljárás

Tegyen 2 x 50µl negatív kontrollt, 1 x 50µl pozitív kontrollt és a hígított mintákat a *C. pneumoniae* antigénnel fedett mikrotitráló lemez celláiba.

Fedje le a lemezeket és inkubálja 1 órán át 37°C-on 100%-os páratartalom mellett.

Mossa 3-szor mosó pufferrel (300-350µl).

Adjon hozzá 50µl 1/300 arányban hígított HRP konjugátumot.

Fedje le a lemezeket és inkubálja 1 órán át 37°C-on 100%-os páratartalom mellett.

Mossa 3-szor mosó pufferrel (300-350µl).

Adjon hozzá 100µl TMB-szubsztrátot.

Fedje le a lemezeket és inkubálja 15 percig szobahőmérsékleten.

Adjon hozzá 100µl leállító (stop) oldatot.

Olvassa le az abszorbanciát 450nm-en.

Számítsa ki és értelmezze az eredményeket.

8. **TMB-szubsztrát:** Használatra kész oldat. 3, 3', 5, 5' – tetrametil-benzidint tartalmaz kromogénként és peroxidot szubsztrátként.

1 flakon, 16ml

9. **Leállító (stop) oldat:** Használatra kész oldat. 1M H₂SO₄-t tartalmaz.

1 flakon, 16ml

11. **Használati utasítás:**

1

Szükséges, de nem szállított anyagok

1. Tiszta teszt csövek a páciens szérumok hígításához.
2. Eldobható műanyag flakon a tömény HRP-konjugátum hígításához.
3. Állítható mikropipetták, vagy többcsatornás pipetták (5-50, 50-200 és 200-1000µl tartományok) és eldobható hegyek.
4. Egy literes térfogatmérő flaska.
5. Egy 50ml-es térfogatmérő cylinder.
6. Mosó flakon.
7. Itatóspapír.
8. Vortex keverő.
9. 37°C-os vízfürdő fedéllel, vagy egy 37°C-os termosztátba helyezett nedveskamra.
10. ELISA-leolvasó 450nm-es szűrővel.
11. Desztillált vagy kétszer ioncserélt víz.

A kit tartalma

Teszt kit 96 meghatározáshoz Katalógus szám A192-01

1. ***C. pneumoniae* antigénnel fedett mikrotitráló lemez:** *C. pneumoniae* antigénnel fedett 96 törhető cella (8x12), páramentesítő kártyát tartalmazó alumínium zacskóba csomagolva.
1 lemez
2. **Koncentrált mosó puffer (20x):** PBS - Tween puffer.
1 flakon, 100ml
3. **IgM-szérumhígító (vörös):** Használatra kész anti-humán IgG puffer oldatban. Kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
2 flakon, 60ml
4. **Konjugátum hígító (zöld):** Használatra kész puffer oldat. Kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
2 flakon, 20ml
5. **Negatív kontroll:** Használatra kész *C. pneumoniae* IgM negatív emberi szérum. Kevesebb, mint 0,05% proklint, és kevesebb, mint 0,1% Na-azidot tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 2,5ml
6. **Pozitív kontroll:** Használatra kész *C. pneumoniae* IgM pozitív emberi szérum. Kevesebb, mint 0,05% proklint, és kevesebb, mint 0,1% Na-azidot tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 2ml
7. **Koncentrált HRP-konjugátum (300x):** Tormaperoxidázal (HRP) konjugált anti-humán IgM (műláncra specifikus). Kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 0,2ml

Figyelmeztetés és előírások

In Vitro diagnosztikai használatra

1. Ez a kit emberi szérumot tartalmaz, amit az FDA által javasolt módszerrel bevizsgáltak, és negatív volt HBV antigénre és HCV és HIV 1&2 antitestekre. 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 vér alkotót potenciálisan fertőző szérumnak vagy vérnek kell tekinteni, a CDC/NIH által kiadott "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988 kézikönyv ajánlásainak megfelelően.
2. A TMB-szubsztrát oldat irritálja a bőrt és a nyálkahártyákat. Óvakodjon a közvetlen érintkezéstől.
3. Minden, a kitben található alkotót a sorozatszám alapján kalibráltak és vizsgáltak. Nem javasolt, hogy különböző sorozatszámú alkotókat keverjen, mivel az befolyásolhatja az eredményeket.
4. A hígított kénsav (1M H₂SO₄) irritálja a szemeket és a bőrt. Ha a szemébe kerül, mossa ki azonnal a területet vízzel és forduljon orvoshoz.

Tárolás és a reagensek használhatósága

1. Minden szállított reagenst 2-8°C-on kell tárolni. A felbontatlan reagens flakonok a kit dobozán lévő lejárati ideig stabilak. Ha az eredeti módon lezárt komponenseket néhány órán át szobahőmérsékleten tartja, attól a reagensek még nem károsodnak. **NE FAGYASSZA!**
2. Felbontás után a kit 90 napig használható.
3. A nem használt csíkokat vissza kell zárni a páramentesítő

kártyát tartalmazó fólia tasakba úgy, hogy a nyitott végét behajítja, és szorosan lezárja egy ragasztószalaggal a nyílás teljes hosszában.

4. A 20x-os töménységű mosó pufferben a hidegben tárolás során kristályok képződhetnek, ez teljesen normális. A kristályok feloldódnak, ha a hígítás előtt 37°C-ra melegíti a puffert. Hígítás után az oldat 2-8°C-on legfeljebb 21 napig tárolható.

Mintavétel

Készítsen szérumot az aszeptikusan, standard eljárással vett mintákból. Hővel inaktivált szérumok nem használhatók. Lipémiás, zavaros vagy szennyezett szérumok használata nem javasolt. A szérumban lévő részecskék, kicsapódások hibás eredményeket okozhatnak. Ezért a vizsgálatot megelőzően ezeket a mintákat centrifugálással vagy szűréssel meg kell tisztítani.

A minták tárolása

A mintákat 2-8°C-on kell tárolni és 7 napon belül vizsgálni (0,1%-os Na-azid hozzáadása erősen javasolt). Ha hosszabb tárolási idő várható, ossza szét és tárolja a mintákat -20°C alatt. Ne olvassza és fagyassza vissza ismételtelen.

Vizsgálati eljárás

A. A reagensek elkészítése

1. Minden alkotót és vizsgálni kívánt klinikai mintát hagyjon szobahőmérsékletűre melegedni. Keverje jól össze a pozitív kontrollt, a negatív kontrollt és a klinikai mintákat a használatuk előtt.
2. Határozza meg a vizsgálni kívánt összes mintaszámot. A mintákon kívül a következőket kell tartalmaznia minden vizsgálatnak: két cella negatív kontroll és egy cella pozitív kontroll.
3. Vegye ki a mikrotitráló lemezt az alumínium csomagolásából, ehhez vágja le az egyik végét a lezárás mellett. Hagyja a szükséges számú csíkot (a vizsgálni kívánt minták száma alapján) a 96 cellás keretben.
4. Hígítsa meg a tömény mosó puffert 1/20 arányban a kétszer ioncserélt vagy desztillált vízzel. Például, 1 liter mosó puffer készítéséhez adjon 50ml koncentrált mosó puffert 950ml kétszer ioncserélt vagy desztillált vízhez.

B. A szérum minták és kontrollok inkubálása

5. **Egylépéses hígítás:** Hígítson meg minden egyes páciens szérumot 1/105 arányban a kapott szérumhígítóval a következő módon: adjon 5µl páciens szérumot 520µl szérumhígítóhoz.
Kétlépéses hígítás: Hígítson meg minden egyes páciens szérumot 1/105 arányban a kapott szérumhígítóval a következő módon: adjon 10µl páciens szérumot 200µl szérumhígítóhoz (1/21), majd hígítsa tovább úgy, hogy az 1/21-es hígításból 25µl-t hozzáad 100µl szérumhígítóhoz.
Megjegyzés: a szérumhígító anti-humán IgG-t tartalmaz, hogy eltávolítsa az emberi szérumban lévő IgG

antitesteket.

6. Tegyen 50µl pozitív kontrollt, negatív kontrollt és 1/105 arányban hígított szérumot a teszt csík külön cellába. **A negatív kontrollt két külön cellába kell tenni.**
7. Fedje le a csíkokat a lemezfedővel, és inkubálja 1 órán át 37°C-on nedves kamrában.
8. Öntse ki a cellák tartalmát.
9. **Mosó lépés:** Töltsön meg minden egyes cellát mosó pufferrel (300-350µl) a cella tetejéig, majd öntse el a folyadékot, ezt a lépést ismételje meg háromszor.
10. Szárítsa meg a csíkokat és a keretet úgy, hogy óvatosan hozzáütogeti egy tiszta itatóspapírhoz.

C. Inkubálás a konjugátummal

11. A tömény HRP-vel konjugált anti-humán IgM-t munkaoldattá kell hígítani közvetlenül a használat előtt. Hígítsa meg a HRP-vel konjugált anti-humán IgM-t 1/300 arányban a konjugátum hígítóval. Például, két csíkhöz készítsen legalább 3ml hígított HRP-konjugátumot (10µl tömény HRP-vel konjugált anti-humán IgM-t keverjen össze 3ml konjugátum hígítóval).
12. Tegyen 50µl hígított konjugátumot minden egyes cellába.
13. Fedje le a csíkokat a lemezfedővel, és inkubálja 1 órán át 37°C-on nedves kamrában.
14. Öntse ki a folyadékot és mossa a 9-10. lépésben leírtak szerint.

D. Inkubálás a TMB - szubsztráttal

15. Tegyen 100µl TMB-szubsztrátot minden egyes cellába, fedje le a csíkokat a lemezfedővel, és inkubálja szobahőmérsékleten **15 percig**.
16. Állítsa le a reakciót 100µl leállító (stop) oldat hozzáadásával (1M H₂SO₄) minden egyes cellában.

E. Az eredmények meghatározása

17. Határozza meg az abszorbanciát 450nm-en és jegyezze fel az eredményeket. A mérést a kromogén reakció leállítását követően 30 percen belül el kell végezni.

Megjegyzés: Minden levegőbuborékot el kell távolítani a leolvasás előtt. Az ELISA lemez alját gondosan meg kell törölni.

A vizsgálat validálása

Érvényes vizsgálatához a következő kritériumoknak kell teljesülniük. Ha ezek a kritériumok nem teljesülnek, a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni, és meg kell ismételni.

1. **Pozitív kontroll:** Az abszorbancia értéke legyen: ≥ 0.8 450nm-en.
2. **Negatív kontroll:** A negatív kontrollok abszorbancia értékeinek átlaga legyen: $0.1 < NC \leq 0.4$ 450nm-en.

A cut off érték (átcsapás érték) (COV) és a cut off index (átcsapás index) (COI) számítása

Az átcapás értékét a következő egyenlettel kell kiszámítani:

$$COV = NC \times 2$$

NC = A párhuzamosan mért negatív kontrollok abszorbancia értékeinek átlaga 450nm-en.

A különböző vizsgálatok során kapott eredmények normalizálásához az átcsapás indexet kell meghatározni a következő egyenlettel:

$$COI = \text{Szérum minta abszorbanciája } 450\text{nm-en} / COV$$

Az eredmények értelmezése

1. táblázat: Korreláció a 450nm-en mért abszorbancia és a *C. pneumoniae* IgM antitestek jelenléte között

Abszorbancia (450 nm)	COI	Eredmények	Értelmezés	Diagnózis
$O.D < 1,4 \times COV$	< 1.4	Negatív	Nincsenek kimutatható IgM antitestek	Nincs jele <i>C. pneumoniae</i> fertőzésnek
$1.4 \times COV \leq O.D \leq 1.5 \times COV$	1.4-1.5	Határeset	Alacsony szintű IgM antitestek	Lehetséges jelei a <i>C. pneumoniae</i> fertőzésnek Második mintát kell vizsgálni 2-4 hét múlva ¹ .
$O.D > 1.5 \times COV$	> 1.5	Pozitív	Jelentős mennyiségű IgM antitest	Akut <i>C. pneumoniae</i> fertőzést jelez.

¹. Határeset eredmény esetében második mintát kell vizsgálni 2-4 hét múlva, együtt az első mintával. Ha a határeset eredményt megismétli, a mintát negatívnak kell tekinteni.

Ahhoz, hogy átfogó antitest profilt kapjon, az IgG és IgA antitesteket is vizsgálni kell.

2. táblázat: Az eredmények értékelése az IgG, IgA és IgM antitest eredmények alapján.

IgM	IgG	IgA	
Negatív	Negatív	Negatív	Nincs jele <i>C. pneumoniae</i> fertőzésnek
Pozitív	Negatív	Negatív	Akut fertőzés jele
	Pozitív	Pozitív	
Negatív	Pozitív	Negatív	Régi vagy akut fertőzés jele
Negatív	Pozitív	Pozitív	Akut vagy krónikus fertőzés jele
	Negatív		

A vizsgálat korlátai

1. Egyetlen szerológiai vizsgálat eredményét nem szabad a végső diagnózis felállításához használni. Minden klinikai és laboratóriumi adatot figyelembe kell venni.
2. Zok a minták, amelyeket az akut fertőzés során túl korán vesznek le, lehet, hogy nem tartalmaznak kimutatható mennyiségben antitesteket, ha Chlamydia fertőzésre van gyanú, második mintát kell vizsgálni 2-4 hét múlva párhuzamosan az eredeti mintával.

Teljesítmény jellemzők

3. táblázat: A SeroCP™ IgM összehasonlítása Chlamydia IgM SeroFIA™ tesztel (MIF)

A SeroCP™ IgM-t a Chlamydia IgM SeroFIA™ tesztel (Savyon Diagnostics Ltd. Cat. No. 512-01) szemben vizsgálták. A vizsgálatot egy egészségügyi központban végezték 113 szérumból, amelyek 33 tüneteket mutató, és 80 egészséges gyerekből származtak.

SeroFIA™	Pozitív	Negatív	Össz
SeroCP™ pozitív	30	4	34
SeroCP™ negatív	3	76	79
Összesen	33	80	113

Szenzitivitás: $30/33 \times 100 = 91\%$

Specifititás: $76/80 \times 100 = 95\%$

Átlagos egyezés: $106/113 \times 100 = 94\%$

Pontosság

Intra-assay (sorozaton belül)

Minta	Ismétlések száma	Középérték	CV%
Pozitív	10	1,469	2,3
Negatív	10	0,236	4,7

Inter-assay (sorozatok között)

Minta	Ismétlések száma	Középérték	CV%
Pozitív	10	0,605	5,4
Negatív	10	0,163	6,0

Irodalom

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmäki, 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.
3. 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.
 4. 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.
 5. 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., Leinonen, 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., Campbell, 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