



SeroCP™ Quant IgG

ELISA vizsgálat a *Chlamydia pneumoniae* ellen termelődött specifikus IgG antitestek szemikvantitatív meghatározására emberi szérumból.

Használati utasítás

Teszt kit 96 meghatározáshoz
(Kat. szám: A291-01)

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@savyondiagnositics.com

Használati javaslat

SeroCP™ Quant IgG kit egy ELISA kit a *Chlamydia pneumoniae* ellen termelődött speciesz-specifikus IgG antitestek emberi szérumból történő szemikvantitatív meghatározására.

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 höröggyulladás 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 títtere 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 négyszeresre, vagy ennél magasabbra emelkedett IgG antitest szintek fennálló krónikus fertőzést jelezhetnek.

A SeroCP™ Quant 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™ Quant lemezeket tisztított *C. pneumoniae* elemi testekkel (TWAR-183) fedetten szállítják.
- A vizsgálni kívánt szérumot meghígítva 1 órán át kell inkubálni SeroCP™ Quant lemezben 37°C-on. Ebben a lépésben a *C. pneumoniae* antitestek lekötiődnek az immobilizált antigénekhez.
- A nem specifikus antigéneket mosással távolítjuk el.
- Tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-humán IgG-t kell a rendszerhez adni, és inkubálni 1 órán át 37°C-on. Ebben a lépésben a HRP-konjugátum megkötődik az előzőleg lekötiődött 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 mérteni az ELISA leolvasóval 450/620nm-es hullámhosszon.
- Az abszorbancia arányos a fedett antigénekhez kötődött specifikus antitestek mennyiségével.

A kit tartalma

Teszt kit 96 meghatározáshoz

- C. pneumoniae antigénnel fedett mikrotitráló lemez:** *C. pneumoniae* antigénnel fedett 96 törhető cella (8x12), páramentesítő kártyát tartalmazó alumínium zacskóba csomagolva.
1 lemez
- Koncentrált mosó puffer (20x):** PBS - Tween puffer (pH 7.4-7.6), ami NaCl-ot, Na₂HPO₄-t, KH₂PO₄-t és Tween 20-t tartalmaz.
1 flakon, 100ml
- Szérumhígító (kék):** Használatra kész puffer oldat. Kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
1 flakon, 60ml
- Konjugátum hígító (zöld):** Használatra kész puffer oldat. Kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
1 flakon, 40ml
- Negatív kontroll:** Használatra kész *C. pneumoniae* IgG negatív emberi szérum. Kevesebb, mint 0,1% Na-azidot tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 2ml
- Pozitív kontroll:** Használatra kész *C. pneumoniae* IgG pozitív emberi szérum. Kevesebb, mint 0,1% Na-azidot tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 2ml
- P10-kalibrátor:** Használatra kész *C. pneumoniae* IgG pozitív emberi szérum, 10 BU/ml (kötő egység) IgG-t tartalmaz. Kevesebb, mint 0,1% Na-azidot, és kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 2ml
- P50-kalibrátor:** Használatra kész *C. pneumoniae* IgG pozitív emberi szérum, 50 BU/ml (kötő egység) IgG-t tartalmaz. Kevesebb, mint 0,1% Na-azidot, és kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 2ml
- P100-kalibrátor:** Használatra kész *C. pneumoniae* IgG pozitív emberi szérum, 100 BU/ml (kötő egység) IgG-t tartalmaz. Kevesebb, mint 0,1% Na-azidot, és kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 2ml
- Koncentrált HRP-konjugátum (300x):** Tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-humán IgG (gamma-láncra specifikus). Kevesebb, mint 0,05% proklint tartalmaz tartósítószerként.
1 üveg, 0.2ml
- TMB-szubsztrát:** Használatra kész oldat. 3, 3', 5, 5' – tetrametil-benzidint tartalmaz kromogénként és peroxidot szubsztrátként.
1 flakon, 14ml
- Leállító (stop) oldat:** Használatra kész oldat. 1M H₂SO₄-t tartalmaz.
1 flakon, 15ml
- Lemezfedő:**
1 darab
- Használati utasítás:**
1

Szükséges, de nem szállított anyagok

- Tiszta teszt csövek a páciens szérumok hígításához.
- Eldobható műanyag flakon a tömény HRP-konjugátum

- hígításához.
- Állítható mikropipetták, többcsatornás pipetták (5-50, 50-200 és 200-1000µl tartományok) és eldobható hegyek.
- Egy literes térfogatmérő flaska.
- Egy 50ml-es térfogatmérő cylinder.
- Mikrolemez mosó vagy mosó flakon.
- Itatópapír.
- Vortex keverő.
- 37°C-os vízfürdő fedéllel, vagy egy 37°C-os termosztátba helyezett nedveskamra.
- ELISA-leolvasó 450nm-es és 620nm-es szűrőkkel.
- Desztillált vagy kétszer ioncserélt víz.

Figyelmeztetés és előírások

In Vitro diagnosztikai használatra

- 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 véralkotót potenciálisan fertőző szérumnak vagy vérnek kell tekinteni, a CDC/NIH által kiadott "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988 kézikönyv ajánlásainak megfelelően.
- A TMB-szubsztrát oldat irritálja a bőrt és a nyálkahártyákat. Óvakodjon a közvetlen érintkezéstől.
- Minden, a kitben található alkotót a sorozatszám alapján kalibráltak és vizsgáltak. Nem javasolt, hogy különböző sorozatszámú alkotókat keverjen, mivel az befolyásolhatja az eredményeket.
- 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

- 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!**
- Felbontás után a kit 90 napig használható.
- A nem használt csíkokat vissza kell zárni a páramentesítő kártyát tartalmazó fólia tasakba úgy, hogy a nyitott végét behajtja, és szorosan lezárja egy ragasztószalaggal a nyílás teljes hosszában.
- 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 aseptikusan, 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 - kézi

z automatákon alkalmazható protokollokat kérésre megküldjük.

A. A reagensek elkészítése

1. Minden alkotót és vizsgálni kívánt klinikai mintát hagyjon szobahőmérsékletűre melegedni. Keverje jól össze a kalibrátorokat (P10, P50, P100), negatív és pozitív kontrollokat, a klinikai mintákat a használatuk előtt.
2. Határozza meg a vizsgálni kívánt összes mintaszámot. A mintákon kívül a következőket kell tartalmaznia minden vizsgálatnak: egy cella pozitív kontroll, egy cella negatív kontroll, és három cella a kalibrátoroknak (P10, P50, P100).
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. Hígítson meg minden egyes páciens szérumot 1/400 arányban a kapott szérumhígítóval a következő lehetőségek egyikével:
 - a. **Javasolt automata rendszer használata esetén: (Ez a módszer eggyel több flakon szérumhígítót igényel).**
 - Adjon 10µl páciens szérumot 990µl szérumhígítóhoz (1:100).
 - Adjon 45µl szérumhígítót a tesztsík minden egyes cellájába. Tegyen 15µl 1:100 arányban előre hígított mintát minden egyes cellába.
 - Adjon 60µl használatra kész pozitív kontrollt, negatív kontrollt és 3 kalibrátort (P10, P50, P100) külön-külön cellákba.
 - b. **Javasolt manuális rendszer használata esetén:**
 - Adjon 10µl páciens szérumot 190µl szérumhígítóhoz (1:20).
 - Hígítsa tovább úgy, hogy 10µl 1:20 hígítást ad 190µl szérumhígítóhoz.
 - Adjon 50µl használatra kész pozitív kontrollt, negatív kontrollt és 3 kalibrátort (P10, P50, P100) külön-külön cellákba.
6. Fedje le a csíkokat a lemezfedővel, és inkubálja 1 órán át 37°C-on nedves kamrában.
7. Öntse ki a cellák tartalmát.
8. **Mosó lépés:** Töltsön meg minden egyes cellát mosó

pufferrel (300-350µl) a cella tetejéig, majd öntse el a folyadékot, ezt a lépést ismételje meg kétszer, összesen három mosó lépést végezzen.

9. Szárítsa meg a csíkokat és a keretet úgy, hogy óvatosan hozzáütögeti egy tiszta itatóspapírhoz.

C. Inkubálás a konjugátummal

10. A tömény HRP-vel konjugált anti-humán IgG-t munkaoldattá kell hígítani közvetlenül a használat előtt. Hígítsa meg a HRP-vel konjugált anti-humán IgG-t 1/300 arányban a konjugátum hígítóval. Például, két csíkhöz készítsen legalább 3 ml hígított HRP-konjugátumot: 10µl tömény HRP-vel konjugált anti-humán IgG-t keverjen össze 3ml konjugátum hígítóval).
11. Tegyen 50µl hígított konjugátumot minden egyes cellába.
12. Fedje le a csíkokat a lemezfedővel, és inkubálja 1 órán át 37°C-on nedves kamrában.
13. Öntse ki a folyadékot és mossa a 8-9. lépésben leírtak szerint.

D. Inkubálás a TMB - szubsztráttal

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

E. Az eredmények meghatározása

16. Határozza meg az abszorbanciát 450/620nm-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 vizsgálathoz a következő kritériumoknak kell teljesülniük. Ha ezek a kritériumok nem teljesülnek, a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni, és meg kell ismételni.

1. O.D_{P100/P10} > **2.5**
2. O.D_{P50/P10} > **1.7**
3. A negatív kontroll legyen < **10 BU/ml**
4. A pozitív kontroll legyen > **30 BU/ml**

A vizsgálati eredmények számítása

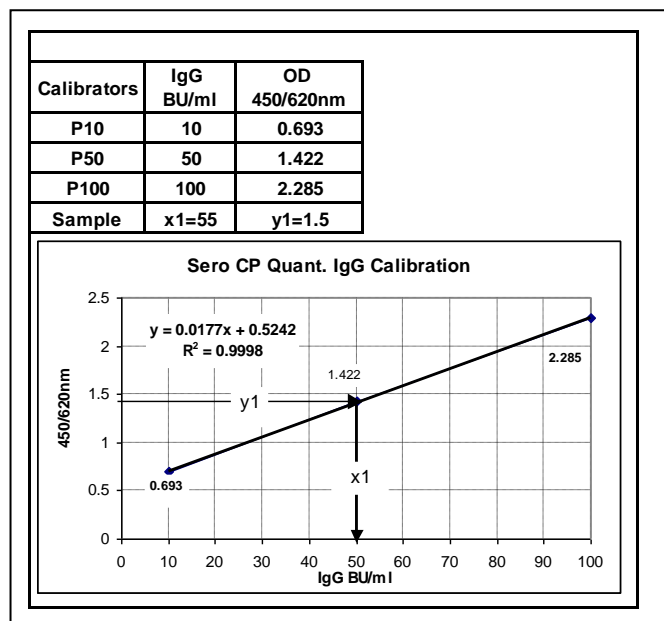
Manuális módszer, négyzethálós papíron:

1. Ábrázolja a 3 kalibrátor (P10, P50, P100) abszorbancia értékeit (OD) az Y tengelyen, a koncentrációikat (BU/ml) pedig az X tengelyen.
2. Rajzolja meg a legjobban illeszkedő egyenest a három ponton keresztül.
3. A standard görbe segítségével határozza meg a vizsgálati minták koncentrációját (BU/ml-ben) a mért abszorbanciájuk alapján (nézze meg az 1. példát).

1. példa: Az eredmények meghatározása

Az Y-tengelyen olvassa le a minta abszorbancia értékét és húzzon egy vízszintes vonalat a kalibrációs görbéig.

A metszésponttól húzzon egy függőleges vonalat az X-tengelyre és olvassa le a minta koncentrációját BU/ml-ben.



Korreláció a SeroCP™ Quant eredmények és a SeroFIA™ IgA – MIF végpont titerek (EPT) között

A SeroCP™ Quant IgA szemikvantitatív kitet együtt kalibrálták a SeroFIA™ IgA (Savyon Diagnostics Ltd., Israel) MIF teszttel. A korreláció az 1. táblázatban látható.

SeroCP™ Quant IgA BU/ml	SeroFIA™ IgA Végpont titerek
< 10	Negatív
10 - 30	64
31 - 50	128
51 - 80	256
> 80	≥ 512

Megjegyzés: Nincs standardizálás a különböző MIF-rendszerek eredményei között. Minden MIF tesztnak más lehet az EPT-je.

Teljesítmény jellemzők

A SeroCP™ Quant IgG összehasonlítása a SeroCP™ IgG-vel

A SeroCP™ Quant IgG-t a SeroCP™ IgG-vel szemben értékelték (Savyon Diagnostics Ltd., katalógus szám 191-01). A vizsgálatot 197, tüneteket mutató beteg, és 34 egészséges egyénből vett szérumot felhasználva végezték.

A szenzitivitást és a specifitást számították ki.

Szenzitivitás: $190/197 \times 100 = 96.4\%$

Specifitás: $33/34 \times 100 = 97\%$

Keresztreakció

Kórházban fekvő betegeket, akiket *C. trachomatis*, *CMV* és *EBV* fertőzéssel kezelték, és a kereskedelmi szerológiai kitekkel diagnosztizáltak, megvizsgálták a SeroCP™ Quant kittel is. Nem tapasztaltak jelentős keresztreakciót.

A vizsgálat korlátai

1. Egyetlen szerológiai vizsgálat eredményét nem szabad a végső diagnózis felállításához használni. Minden klinikai és laboratóriumi adatot figyelembe kell venni.
2. Azok 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.
3. Interferáló anyagok: 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.

Az eredmények értelmezése

IgG BU/ml	Eredmények	Értelmezés	Diagnózis
< 10 BU/ml	Negatív	Nincsenek kimutatható IgG antitestek	Nincs jele <i>C. pneumoniae</i> fertőzésnek
≥ 10 BU/ml	Pozitív	Jelentős mennyiségben IgG antitestek	Fennálló vagy krónikus <i>C. pneumoniae</i> fertőzést jelez. ¹

BU: Kötődő egységek

¹ Ahhoz, hogy különbséget tegyen lezajlott és fennálló fertőzés között, javasolt 2-4 hét múlva egy második minta vizsgálata. Ha a második minta EPT (végpont titer) értéke az 1. minta EPT értékének 4-szeresére emelkedik (nézze meg az 1. táblázatot), fertőzést jelent.

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., 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.
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.

Gyártó:

SAVYON DIAGNOSTICS Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610, Israel
Tel: 972.8.8562920 Fax: 972.8.8523176
e-mail: support@savyondiagnosics.com



Képviselet:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels
Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net

Forgalmazó Magyarországon:

Diagnosticum Rt.

1047 Budapest, Attila u. 126.
Tel: (36-1) 369-0739, 369-3684
Fax: (36-1) 369 43 83
e-mail: mail@diagnosticum.hu
Budapest, 2005-06-01