



SeroCP™ Quant IgG

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

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č. A291-01)

Skladujte při 2 – 8°C. **Nezmrazujte.**
Pouze pro *in vitro* stanovení.
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@savyondiagnosics.com

Použití

SeroCP™ Quant IgG se používá pro semi-quantitativní stanovení IgG protilátek specifických proti *Chlamydii pneumoniae* v lidském séru.

Pouze pro *in vitro* diagnostické stanovení.

Úvod

Chlamydia pneumoniae (TWAR-183) 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 neinvazivní 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 SeroCP™ Quant, ve kterém 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™ Quant Jamky destičky jsou pokryty purifikovanými elementárními tělíska antigenu *C. pneumoniae* (TWAR - 183).
- Testované sérum je naředěno a inkubováno v SeroCP Quant 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 IgG 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 zbarveného roztoku.
- Po přidání stop roztoku se zbarvení 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.

Souprava obsahuje

Kit pro 96 stanovení

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

1 Destička

2. **koncentrovaný promývací pufr (20x)**: PBS-Tween pufr, (pH 7,4-7,6), obsahuje NaCl, Na₂HPO₄, KH₂HPO₄, a Tween 20

1 lahvička, 100ml

3. **ředící roztok k ředění sér (modrý)** – , obsahuje méně než 0,05% proclinu jako konzervační prostředek; v pracovní koncentraci

1 lahvička, 60ml

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

1 lahvička, 40ml

5. **negativní kontrola** lidské sérum negativní na IgG protilátky proti *Chlamydii pneumoniae*, obsahuje méně než 0,1% azidu sodného jako konzervační prostředek; v pracovní koncentraci

1 lahvička, 2ml

6. **pozitivní kontrola** lidské sérum pozitivní na IgG protilátky proti *Chlamydii pneumoniae*, obsahuje méně než 0,1% azidu jako konzervační prostředek; v pracovní koncentraci

1 lahvička, 2ml

7. **P10-calibrator:** lidské sérum pozitivní na IgG protilátky proti *Chlamydii pneumoniae*, 10BU/ml, obsahuje méně než 0,1% azidu a 0,05% proclinu jako konzervační prostředek; v pracovní koncentraci 0.05% Proclin.

1 lahvička, 2ml

8. **P50-calibrator:** lidské sérum pozitivní na IgG protilátky proti *Chlamydii pneumoniae*, 50BU/ml, obsahuje méně než 0,1% azidu a 0,05% proclinu jako konzervační prostředek; v pracovní koncentraci 0.05% Proclin.

1 lahvička, 2ml

9. **P100-calibrator:** lidské sérum pozitivní na IgG protilátky proti *Chlamydii pneumoniae*, 100 BU/ml, obsahuje méně než 0,1% azidu a 0,05% proclinu jako konzervační prostředek; v pracovní koncentraci 0.05% Proclin.

1 lahvička, 2ml

10. **HRP koncentrovaný konjugát (300x)** Conjugované Anti-lidské IgG (γ -specifické řetězce); obsahuje méně než 0,05% proclin jako konzervační prostředek

1 lahvička, 0.2ml

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

1 lahvička, 14ml

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

1 lahvička, 15 ml

13. **víčko na mikroděstičku** **1 x**

14. **Návod** **1**

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 H₂SO₄; 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 dodané materiály musí být uchovávány při teplotě 2-8°C. Při této teplotě zůstávají testovací reagensie 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.

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. 50ml 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 450/620nm pro měření mikroděstiček
11. destilovaná nebo dvakrát deionizovaná voda

Pracovní postup - Ruční

Aplikační listy pro automatické zpracování jsou na vyžádání

A. Příprava reagensů.

1. Všechny testovací reagensie před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte kalibrátory (P10, P50, P100) vzorky, pozitivní a negativní kontroly.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuto měření jedné negativní, jedné pozitivní kontroly a tři jamky pro kalibrátory (P10, P50, P100).
3. Vyjměte mikrodestičku z hliníkové folie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných vzorků) z 96 jamkového rámečku.
4. Zředte 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 séra a kontrol.

5. Zředte každý vzorek séra 1/400 dodávaným ředícím roztokem následovně:

a. Ředění doporučené pro automatické systémy:

(Tato metoda vyžaduje zvláštní zásobní nádobu)

- Přidejte 10 μ l séra pacienta k 990 μ l ředícího roztoku (1:100).
- Pipetujte 45 μ l ředícího roztoku do každé jamky stripu. Přidejte 15 μ l předředěného vzorku 1:100 do každé jamky.
- Pipetujte 60 μ l (ready to use) pozitivní kontroly, negativní kontroly, a třech kalibrátorů (P10, P50, P100) do zvláštních jamek.

b. Ředění doporučené pro ruční zpracování:

- Přidejte 10 μ l séra pacienta ke 190 μ l ředícího roztoku (1:20).
 - Následně ředte přidáním 10 μ l roztoku 1:20 ke 190 μ l ředícího roztoku.
 - Pipetujte 50 μ l (ready to use) pozitivní kontroly, negativní kontroly, a třech kalibrátorů (P10, P50, P100) do zvláštních jamek.
6. Přikryjte strip víčkem a dejte inkubovat na 1 hodinu do mlžné komory (37°C).
 7. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek.
 8. **Promývací krok:** naplňte každou jamku promývacím pufrem (300-350 μ l) po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 3x.
 9. Osušte stripy a rámeček jemným poklepáním na absorpčním papíru.

C. Inkubace s konjugátem.

10. Koncentrovaný roztok HRP-konjugátu zředte do pracovní koncentrace těsně před použitím v poměru 1/300 roztokem Conjugate Diluent. Např. pro dva stripy připravte minimálně 3ml zředěného HRP-konjugátu následovně: 10 μ l koncentrovaného roztoku HRP-konjugátu a smíchejte s 3ml roztoku Conjugate Diluent.
11. Odpipetujte 50 μ l zředěného konjugátu do každé z jamek.
12. Přikryjte strip víčkem a inkubujte 1 hodinu při 37°C v mlžné komoře.
13. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek a proveďte promývací krok, jak je uvedeno v bodě 8-9.

D. Inkubování s TMB-substrátem.

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

E. Odečtení výsledků.

16. Proměřte absorbanci při 450/620nm 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. O.D._{P100/P10} > 2.5
2. O.D._{P50/P10} > 1.7
3. NC by mělo být <10 BU/ml
4. PC by mělo být > 30 BU/ml

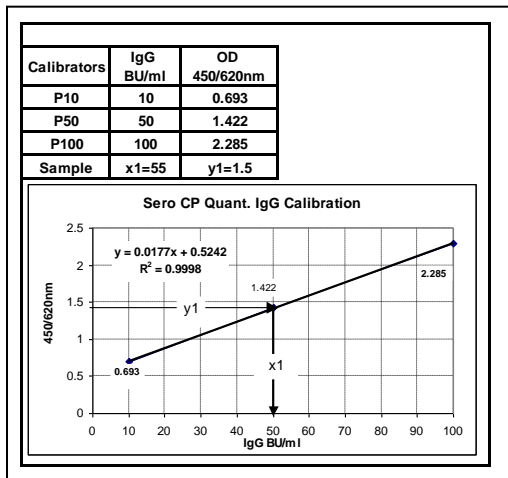
Výpočet výsledku

Manuální metoda, kde se používá milimetrový papír:

1. Vyneste hodnoty absorbance (OD) všech tří kalibračních standardů (P10, P50 a P100) na osu y proti jejich koncentracím v jednotkách BU/ml na ose x.
2. Vzniklými body vhodně proložte základní lineární křivku.
3. Použitím standardní křivky odečítejte hodnoty testovaných vzorků (v jednotkách BU/ml) z naměřených absorbancí jednotlivých testovaných vzorků pacientů (viz př.1).

Příklad 1. Interpolace výsledků:

Na osu Y vynesete hodnoty absorbance vzorku (Y1) a nakreslete horizontální čáru ke kalibrační křivce. Z daného bodu vedte vertikální čáru k ose X. Odečtěte koncentraci vzorku v BU/ml.



Interpretace výsledků

IgG BU/ml	Výsledek	Diagnostická interpretace
< 10 BU/ml	Negativní Nedetekovatelné IgG protilátky	Žádné známky infekce <i>C. pneumoniae</i>
≥10 BU/ml	Positivní Relevantní hladina IgG protilátek	Vypovídá o probíhající nebo chronické infekci <i>C. pneumoniae</i> ¹

BU: Vazebné jednotky

¹ K rozlišení mezi probíhající a současnou infekcí, se doporučuje odebrat druhý vzorek za 2-4 týdny. Pokud je hodnota ETP druhého vzorku 4x vyšší než ETP hodnota prvního vzorku, infekce je indikovaná.

Korelace mezi výsledky SeroCP™ Quant a SeroFIA™ IgG – MIF End Point Titers (EPT)

SeroCP™ Quant IgG semi-kvantitativní test byl kalibrován srovnáním s SeroFIA™ IgG (Savyon Diagnostics Ltd., Israel) metoda MIF. Korelace je uvedena v tabulce č.1.

Korelace mezi SeroCP™ Quant. BU/ml a SeroFIA EPT je uvedena v následující tabulce č.1.

Tabulka č.1

SeroCP™ IgG Quant Rozsah v BU/ml	SeroFIA™ IgG End Point Titry
<10	Neg
10-30	64
31-50	128
51-80	256
>80	≥512

Poznámka: Mezi jednotlivými MIF systémy neexistuje standardizace. Každý MIF test může mít jiné EPT.

Chování testu

Srovnání mezi SeroCP™ Quant IgG a SeroCP™ IgG

Souprava SeroCP™ Quant IgG byla srovnávána se soupravou SeroCP™ IgG (Savyon Diagnostics, katalogové číslo 191-01).

Ke srovnání se použilo 197 vzorků sér symptomatických jedinců a 34 vzorků sér zdravých lidí.

Sensitivita a specifita byla vypočítána následovně:

Sensitivita: 190/197=96,4%

Specifita: 33/34=97%

Zkřížená reaktivita

Hospitalizovaní pacienti, infikovaní *C. trachomatis*, *CMV* a *EBV*, byly diagnostikovány komerčně dostupnými kity. Tyto pacienti byli testováni též kitem SeroCP™ Quant. Nebyly zaznamenány žádné známky zkřížené reaktivity

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.
- Používání lipemických, turbidních a kontaminovaných sér se nedoporučuje. Zakalení a precipitace v sérech může být příčinou špatných výsledků. Tyto vzorky by měly být před testováním vyčištěny centrifugací nebo filtrací.

Literatura

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., 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: 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