

CHLAMYCHECK IgG & IgA



IMUNOBLOT pro detekci IgG a IgA protilátek proti *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* a *Chlamydia psittaci* v lidském krevním séru.

Kat.č.: 5487

Pro použití *in vitro*.

1. Obecné aspekty

CHLAMYCHECK je kvalitativní *in vitro* test pro detekci IgG a IgA protilátek proti proteinovým antigenům *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* a *Chlamydia psittaci*.

Použitím různých rekombinantních antigenů Chlamydie podává analýza na první pohled informaci o protilátkách, specifických pro jednotlivé druhy Chlamydií.

Díky oddělenému rozložení antigenů umožňuje CHLAMYCHECK bezpečnou identifikaci specifických protilátek proti předním antigenům *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* a *Chlamydia psittaci*.

V CHLAMYCHECKu jsou použity tyto rekombinantní antigeny v následujícím pořadí:

<i>Chlamydia trachomatis</i> :	MOMP (40kDa), OMP2 (56kDa), HSP60 (58kDa), MIP (25kDa),
<i>Chlamydia pneumoniae</i> :	MOMP (43kDa), OMP2 (56kDa), OMP4 (100kDa), OMP5(94kDa),
<i>Chlamydia psittaci</i> :	MOMP (43kDa).

2. Chlamydiová infekce

Chlamydia trachomatis je patogenní bakterie, která je první příčinou sexuálně přenosného onemocnění, které může vést k vážným komplikacím, jako je sekundární sterilita a extra-děložní těhotenství.

U žen je většina infekcí (60 až 80%) asymptomatických, ale klinická studie ukazuje přítomnost hnisavé cervicitis, endometritis, salpingitis. Pozorování ukazují často koinfekce, způsobené jinými agens, které jsou odpovědné za STD, způsobené hlavně gonokokem. Odhaduje se, že mezi 44 a 79% žen postižených gonokokem jsou také infikovány Ch.trachomatis. V několika studiích, případových studiích a studiích skupin byla infekce Chlamydií spojena s komplikacemi, jako je například syndrom zánětu pánve (PIS), neplodnost a mimoděložní těhotenství. Sérologické studie ukazují, že 64% nebo více tubulárních neplodností a 42% mimoděložních těhotenství jsou způsobeny Chlamydiovou infekcí. Sexuálně aktivní ženy mezi 15 a 19 lety jsou silněji vystaveny infekci Chlamydia, jsou následovány skupinou od 20 do 25 let. Mezi další faktory spojené s rizikem akutní infekce figuruje pohlavní styk s dvěma nebo více partnery za rok nebo skutečnost, zda má žena nového partnera v předchozím roce, zda patří do defavorizované sociálně-ekonomické třídy, zda používá jinou antikoncepci než prezervativy, dále intermenstruační vaginální fluor, a hnisavé výtoky během provádění testu. Míra infekce těhotných žen se pohybuje mezi 5 a 25%. V následné studii trpělo 11 až 44% dětí narozených infikované matce a infikované touto bakterií na zánět spojivek a 11 - 20% na zápal plic během prvního roku života.

U mužů je Ch.trachomatis původcem různých potíží, včetně urethritis, epididymitis a zánětu spojivek. Někteří autoři popisovali případy onemocnění prostaty a kolitidy, způsobené homosexuálním přenosem infekce. Ne všichni odborníci však souhlasí s tím, že infekce Ch.trachomatis může způsobit prostatitu. Až 50% deklarovaných případů nesplňuje negonokokovou uretritidu a 31% akutních epididymitis jsou způsobeny infekcí Ch.trachomatis. Odhaduje se, že 1% až 21% všech mužů jsou asymptomatickými přenašeči Ch.trachomatis a mohou představovat rezervoár infekce. S vysokým rizikem nákazy Chlamydiovou infekcí jsou spojeny různé proměnné, jako je mladý věk, multiplicita sexuálních partnerů nebo antecedentů kapavky v předchozím roce.

Chlamydia pneumoniae je také patogenní druh, zodpovědný za infekce dýchacích cest. Může být zachycena dětmi i dospělými a mnoho infekcí se zdá být benigní a asymptomatické. Odhaduje se, že CP je odpovědná za 5% případů akutní bronchitidy a 9% astmatických záchvatů u dospělých. Klinika je velmi blízko k infekcím mycoplasma pneumoniae. To také vedlo k podezření na koronární onemocnění (J. z American College of cardiology 06/1996), akutní pankreatitidu, perikarditidu, myokarditidu, encefalitidu, meningitidu, sarkoidózu, dermatitidu contusififormis.

Chlamydia psittaci: se nachází v celém světě zvířat (psi, skot, ovce). Člověk je jen příležitostný host. Za psitakózu se označuje onemocnění papoušků, andulek a kanárů, stejně jako onemocnění lidí. Lidská psitakóza vede k bronchopneumonii.

3. Diagnóza

Diagnóza infekcí Chlamydia se v současné době provádí přímými a nepřímými metodami. Přímé metody (molekulárně biologické, přímá imunofluorescence nebo imunoenzymatické techniky), často vyžadují bolestivé odběry pomocí výtěrů

Sérologická diagnostika chlamydiových infekcí je zajímavým doplňkem k přímé diagnostice, protože umožňuje odhalit akutní genitální infekci a infekci dýchacích cest. Referenční metodou pro sérologické diagnózy je mikroimunofluorescence (MIF), technika, která detekuje protilátky zachycené na celém povrchu bakterie chlamydia. Tato technika je pracná, se subjektivním výkladem a představuje nevýhodu zkřížené reaktivity mezi různými druhy chlamydie, ale také mezi chlamydiemi a jinými bakteriemi. Tento nedostatek specifčnosti je dán přítomností lipopolysacharidu (LPS) na povrchu bakterie.

Souprava CHLAMYPHECK, díky použití rekombinantních proteinů specifických pro 3 druhy, umožňuje poskytnout konkrétní diagnózu. Použití více antigenů zaručuje větší citlivost a pomáhá získat sérologické profily.

Tab.1: rekombinantní antigeny používané v soupravě CHLAMYPHECK:

antigen	Popis
MOMP Ch.trachomatis Ch.pneumoniae Ch.psittaci	"Hlavní protein vnější membrány", nejdůležitější imunodominantní antigen vnější membrány; Rozdíly v aminokyselinové sekvenci následujících antigenů tří lidských patogenních původců: C. pneumoniae a C. trachomatis: 35,5% rozdíl C. pneumoniae a C. psittaci: 27,9% rozdíl C. trachomatis a C. psittaci: 33,9% rozdíl Tyto rozdíly umožňují rozlišení tří druhů.
OMP2 Ch.trachomatis Ch.pneumoniae	« protein 2 vnější membrány»; protein vnější membrány s vysokou koncentrací cysteinu; univerzální indikátor chlamydiové infekce.
HSP60 Ch.trachomatis	«Protein tepelného šoku 60", potenciální ukazatel chronické zánětlivé infekce pro Chlamydia trachomatis (faktor tubulární neplodnosti, reaktivní artritida).
MIP Ch.trachomatis	„násobitel makrofágové efektivity“; antigen specifický pro druh Ch.trachomatis
OMP4 Ch.pneumoniae	„Protein vnější membrány 4“; specifický pro druh, lokalizovaný na povrchu Ch.pneumoniae
OMP5 Ch.pneumoniae	„protein vnější membrány 5“; specifický pro druh, protein vnější membrány, lokalizovaný na povrchu Ch.pneumoniae

4. Princip testu

Na nitrocelulóзовou membránu jsou navázány rekombinantní, vysoce purifikované proteiny. Tato matrice je poté rozdělena na jednotlivé proužky.

K usnadnění detekce protilátek specifických pro Chlamydie, jsou proužky inkubovány se zředěným vzorkem séra, přičemž protilátky se váží na antigeny na proužku. Nenavázané protilátky jsou pak vymyty a proužky se inkubují ve druhém kroku s anti-lidskými IgG nebo IgA spolu s křenovou peroxidázou. Specificky vázané protilátky jsou detekovány pomocí barevné reakce katalyzované peroxidy. Pokud dojde k reakci antigen-protilátka, zobrazí tmavý pás v příslušném místě na proužku.

Na horním konci testovacího proužku jsou vedle sebe čtyři kontrolní bandy:

1. Reakční kontroly pod číslem testovacího proužku: musí se objevit při každém testu
2. dva kontrolní bandy konjugátu (IgG/IgA): slouží jako kontroly pro třídu protilátek detekovanou v daném testu. Je-li testovací proužek použit pro detekci IgG protilátek, kontrolní band konjugátu pro IgG je jasně ohraničený. Toto analogicky platí i v případě použití IgA konjugátu.
3. cut-off kontrola: pro kontrolu barvicího procesu a k vyhodnocení testovacího proužku; intenzita tohoto bandu poskytuje základ pro hodnocení reaktivity protilátek proti chlamydiím v séru jako pozitivní, hraniční nebo negativní.

5. Obsah soupravy

Každá souprava obsahuje reagenty v množství dostačujícím pro 40 vyšetření (20 IgG + 20 IgA nebo 40 IgG).

Každá souprava obsahuje:

zkumavka	2 ks	Zkumavka s 20 číslovanými testovacími proužky potaženými rekombinantními antigeny chlamydií
Promývací pufr A 10x	100 ml	promývací pufr A (10x koncentrovaný), obsahuje fosfátový pufr, NaCl, KCl, detergent, konzervační látky: MIT (0,1%) a oxyprion (0,2%)
Mléčný prášek	2 x 2,5 g	Pěnivý mléčný prášek
Substrát TBM	2 x 40 ml	Substrátový roztok tetramethylbenzidin(TMB, připraveno k přímému použití)
IgG konjugát 100x konc.	2 x 500 ul	anti-lidský IgG konjugát (zelené víčko, 100x koncentrovaný). Králičí, obsahuje NaN ₃ (<0,1%), chloracetamid (<0,1%)
IgA konjugát 100x konc.	500 ul	anti-lidský IgA konjugát (bezbarvé víčko, 100x koncentrovaný). Králičí, obsahuje NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%), chloracetamid (<0,1%)
Inkubační misky	2	Inkubační misky, každá po 10 jamkách
Plastová pinzeta	1	Plastová pinzeta
Návod k použití	1	Návod k použití
Formulář pro vyhodnocení	2	2 formuláře pro vyhodnocení

6. Další potřebné reagenty a vybavení, které nejsou součástí soupravy

Deionizovaná voda, vakuový extrakční systém s desinfekcí, mikropipety, třepačka, odměrný válec se stupnicí, váha.

7. Informace o testu a reagentech

7.1 Bezpečnostní opatření

- Pracujte v jednorázových ochranných rukavicích.
- Konjugát obsahuje azid sodný, MIT (methylisothiazolon) a chloracetamid. Vyhněte se kontaktu s kůží a sliznicemi.
- Všechny reagenty a materiál, který přijde do kontaktu s potenciálně infekčními vzorky, musí být vydesinfikován nebo autoklávován 1 hodinu při 121°C
- Inkubační misky nepoužívejte opakovaně.
- S proužky pracujte opatrně pomocí plastové pinzety.

7.2 Informace o zacházení se soupravou

- Skladujte reagenty před a po použití při 2°C - 8°C, **chraňte před mrazem**. Temperujte všechny komponenty před zahájením analýzy po dobu nejméně 30 minut při 18°C - 25°C (pokojová teplota). Jak analýza, tak inkubační procesy jsou prováděny při pokojové teplotě.
- Identické reagenty (dle vytištěného symbolu) ve všech recomBlot a imunoblot testech mohou být použity bez ohledu na parametr nebo šarži. Berte v potaz datum expirace jednotlivých komponent.
- Koncentrované konjugáty před použitím dobře promíchejte. Pacientská séra před použitím také dobře promíchejte.
- Zkumavky obsahující testovací proužky otevřete až těsně před použitím, aby se zabránilo kondenzaci vody. Proužky, které se nepoužívají, musí být ponechány ve zkumavce a uloženy při 2°C - 8°C (zkumavku pevně uzavřete, testovací proužky nesmí před analýzou zvlhnout!).
- Proužky jsou očíslovány a označeny zkratkou příslušného testu.
- Záruka kvality může být poskytnuta pouze do uplynutí doby použitelnosti na obalech.
- Chraňte prosím všechny komponenty soupravy před přímým slunečním světlem.
- Zkouška musí být provedena dobře vyškoleným a oprávněným kvalifikovaným personálem.

- V případě podstatné změny výrobku nebo v případě nedodržení podmínek uvedených v návodu k použití, se může aplikace testu lišit od původního záměru výrobce.
- Automatizace je možná, v případě zájmu se prosím obraťte na svého dodavatele pro podrobnosti.

7.3 Příprava roztoků

7.3.1 Příprava promývacího pufru A k přímému použití

Tento pufr se používá jak pro ředění séra, tak pro ředění konjugátu a promývání. Před zředěním je nutné stanovit objem promývacího pufru potřebného pro odpovídající počet testů. Mléčný prášek nejprve rozpustíte v koncentrovaném promývacím pufru. Tuto směs poté doplňte deionizovanou vodou na konečný objem (ředění: 1 + 9). Viz tabulka 2 pro požadovaná množství. Objemy pro počet testovacích proužků, které nejsou uvedeny v tabulce, určete na základě výpočtu. Promývací pufr připravený pro přímé použití lze skladovat při teplotě 2°C - 8°C po dobu čtyř týdnů.

Tab.2: Promývací pufr A pro použití na proužky:

Počet použitých proužků	Mléčný prášek	Koncentrát promývacího pufru A	Deionizovaná voda	Promývací pufr A připravený k přímému použití
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5 g	50 ml	450 ml	500 ml
40	4 g	80 ml	720 ml	800 ml

7.3.2 Příprava roztoků konjugátu

Roztok konjugátu musí být připraven bezprostředně před použitím. Konjugát připravený k přímému použití nelze dále skladovat. Jeden díl koncentrovaného IgA nebo IgG konjugátu je ředěn 100 díly promývacího roztoku připraveného k přímému použití (1+100). Použité objemy jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab.3: Objemy pro ředění anti-lidského IgG nebo IgA konjugátu

Počet použitých proužků*	Koncentrát IgG/IgA konjugátu	Promývací pufr A připravený k přímému použití
1	20 ul	2 ml
2	40 ul	4 ml
3	60 ul	6 ml
5	100 ul	10 ml
10	200 ul	20 ml
20	400 ul	40 ml
25	500 ul	50 ml

* Objemy počítejte bez mrtvých objemů. V závislosti na zpracování (manuální nebo automatizované) připravte roztok konjugátu pro další 1-3 proužky.

7.3.3 Roztok substrátu

Substrát je připraven k přímému použití! Před započítím analýzy temperujte roztok na pokojovou teplotu (18-25°C). Pipetujte vždy čistou špičkou, aby nedošlo ke kontaminaci roztoku substrátu a následnému snížení citlivosti testu.

7.4 Skladování a stabilita

Reagencie skladujte po použití při teplotě 2-8°C.

Promývací pufr připravený k přímému použití může být skladován při 2-8°C po dobu 4 týdnů.

Roztok konjugátu musí být připraven vždy čerstvý.

8. Vzorky

Jako vzorek může být použito sérum nebo plazma. Musí být odděleny od koagulátu co nejdříve po odběru vzorků, aby se zabránilo hemolýze. Za žádných okolností nesmí být vzorky opakovaně zmrazovány a rozmrazovány. Tepelně inaktivované vzorky mohou poskytnout zvýšenou hladinu pozadí. Je třeba se vyhnout mikrobiální kontaminaci vzorku. Nerozpustné látky se odstraní ze vzorku před inkubací pomocí centrifugace.

Použití lipemických, hemolytických nebo zakalených vzorků může poskytnout tmavé pozadí. Tyto vzorky mohou mít také za následek špatné výsledky, a proto by neměly být používány.

Důležité!

Jestliže se analýza neprovádí okamžitě, mohou být vzorky uchovávány po dobu až 2 týdnů při teplotě 2°C - 8°C. Delší skladování vzorků, je možné při teplotě -20°C nebo chladnějším. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků není doporučeno, protože to může mít vliv na kvalitu výsledků.

9. Postup testu

9.1 Obecné

Reprodukovatelnost výsledků závisí do značné míry i na promývání proužků. Frekvence mytí popsané v odst. 9.3. a 9.5. je nutné vždy dodržet.

9.2 Inkubace vzorků

1. Jeden žlábek inkubační misky je určen pro jedno testované sérum. Do každého žlábku pipetujte **2 ml** promývacího pufru připraveného k přímému použití. Následně každý testovací proužek (označenou stranou vzhůru) pomocí plastové pinzety opatrně ponořte do příslušného žlábku naplněného promývacím pufrům. Číslo proužku musí být otočeno směrem vzhůru.

Důležité! Proužky musí být v promývacím pufru zcela ponořeny.

Zkumavku a číslo použitého proužku si zaznamenejte do vyhodnocovací tabulky.

2. Přidání vzorků

IgG/IgA pracovní postup: 20 ul neředěného vzorku (lidské sérum nebo plazma) pipetujte do odpovídajících žlábků (vznikne tak **ředění 1 + 100**).

Zaznamenejte čísla vzorků a třídu imunoglobulinů, pro kterou test provádíte (IgG, IgA) do vyhodnocovací tabulky.

Zakryjte inkubační misku plastovým krytem a za jemného třepání při pokojové teplotě **1 hodinu** inkubujte.

Důležité! Dejte pozor, aby se inkubované roztoky nedostaly do jiných žlábků; zabraňte zejména vystříknutí tekutiny při otevírání a zavírání víčka (riziko křížové kontaminace).

9.3 Promytí

1. Po inkubaci opatrně sejměte plastový kryt z inkubačních misek.
2. Naředěné séra z jednotlivých žlábků opatrně odsajte.

Důležité! Každý roztok odsávejte čistou nebo v deionizované vodě důkladně vypláchnutou špičkou, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků. Při použití automatické promývačky dbejte pokynů výrobce.

3. Poté pipetujte do každého žlábku **2 ml** promývacího pufru připraveného k přímému použití a pro důkladné promytí **5 minut** jemně třepejte. Po uplynutí této doby promývací pufr odsajte.
4. Opakujte **tříkrát** bod 3.

9.4 Inkubace s peroxidasovým konjugátem

Po promytí proužků pipetujte do každého žlábku **2 ml** připraveného roztoku **konjugátu** (viz tabulka 3) a za jemného třepání při pokojové teplotě inkubujte **45 minut**. Inkubační miska musí být opět zakryta plastovým víčkem.

9.5 Promytí

Roztok konjugátu z jamek odsajte a proužky opět promyjte (viz 9.3).

9.6 Reakce se substrátem

1. Do každého žlábků přidejte **1,5 ml roztoku substrátu** a za mírného třepání **5-10 minut** inkubujte při pokojové teplotě.
2. Reakci můžete ukončit, jakmile je viditelný cut-off kontrolní band.

9.7 Zastavení reakce

1. Po odsátí roztoku proužky **tříkrát** krátce **promyjte v deionizované vodě**.
2. Poté je pinzetou opatrně vyjměte, vložte mezi 2 vrstvy savého papíru a vysoušejte asi 2 hodiny. Proužky pak můžete přilepit k přiložené vyhodnocovací tabulce. Výsledek zapište do protokolu.
3. Proužky by měly být skladovány tak, aby byly chráněny před světlem.

10. Souhrn pracovního postupu

1.	Vytemperujte všechny reagenty na pokojovou teplotu.
2.	Pipetujte 2 ml promývacího pufru připraveného k přímému použití do každého žlábků inkubační misky a plastovou pinzetou opatrně vložte testovací proužek označenou stranou vzhůru. Proužky musí být zcela ponořeny.
3.	Do odpovídajícího žlábků pipetujte 20 ul neředěného vzorku.
4.	Inkubační misku zakryjte a za jemného třepání inkubujte 1 hodinu při teplotě (18-25°C).
5.	Opatrně sejměte víčko a tekutinu odsajte (pozor na křížovou kontaminaci vzorků).
6.	Tříkrát po 5 minutách na třepačce promyjte.
7.	Do každého žlábků pipetujte 2 ml připraveného roztoku konjugátu . Misku zakryjte a za jemného třepání inkubujte 45 minut .
8.	Tříkrát po 5 minutách na třepačce promyjte.
9.	Do každého žlábků pipetujte 1.5 ml roztoku substrátu a jemného třepání 5-10 minut inkubujte při pokojové teplotě.
10.	Proužky promyjte nejméně tříkrát v deionizované vodě.
11.	Proužky nechte 2 hodiny sušit mezi dvěma vrstvami savého papíru. Odečtěte výsledek a vyhodnoťte.

11. Hodnocení

11.1 Hodnocení intenzity proužku

1. Na příložený vyhodnocovací formulář zaznamenejte data, šarži a číslo zkumavky spolu s detekovanou třídou protilátky.
2. Zapište identifikační číslo vzorku na protokol.
3. Nyní přilepte testovací proužky na odpovídající oblasti hodnocení v listu. Postupujte tak, že umístíte proužky s bandem reakční kontroly na označenou linii a použijete pravítko k jejich fixaci. Pak použijte lepicí pásku k upevnění testovacích proužků na označenou linku. Úplné přilepení testovacího proužku lepidlem nebo průhlednou lepicí páskou může vést ke změnám zbarvení.
4. Nyní vyhodnoťte vyvinuté bandy na testovacím proužku (viz tabulka 4) a výsledek zapište do vyhodnocovací tabulky a do protokolu.

11.2 Výsledky kontrol

Test lze hodnotit, jestliže jsou splněny následující podmínky:

- Reakce kontrolního bandu (horní řádek) má výrazné zbarvení, tmavý pás
- třída protilátek (druhý až třetí band): konjugát odpovídající kontrolnímu bandu musí prokázat jasné zbarvení. Druhá konjugátová skupina může vyvinout slabé nespecifické zbarvení.
- Cut-off kontroly (čtvrté pásmo): slabé, ale jasně viditelné zbarvení.

Tab.4: Intenzita bandů ve vztahu ke cut-off

Band	Intenzita
Bez reakce	-
Intenzita slabší než cut-off	±
Minimálně stejná intenzita jako cut-off	+
Vysoká intenzita (silnější než cut-off)	++
Velmi silná intenzita	+++

Důležité! Bandy v soupravě CHLAMYCHECK IgG/IgA mohou při testu vykazovat různé intenzity. Je možné, že CHLAMYCHECK IgG ukáže intenzivnější a tmavší pásy, než CHLAMYCHECK IgA. Intenzita proteinových bandů závisí na koncentraci Chlamydia-specifické protilátky.

11.3 Výsledky testu a interpretace

Bodově založené hodnocení antigenů Chlamydia v soupravě CHLAMYCHECK bylo provedeno na základě klinických hodnocení a matematické analýzy s cílem zajistit jednoduché a bezpečné hodnocení testu. Na tomto základě je možné výsledky testu získat sečtením bodů, následuje vyhodnocení. Výsledek analýzy se získá sečtením bodových hodnot z pásem hodnocených +, ++ nebo +++ . Výsledná hodnota je zapsána ve sloupci znaménkem plus. Pozitivní, sporné nebo negativní hodnocení vzorku může být určeno přímo a zapsáno do kolonky „hodnocení“
Pro třídu protilátek IgG a IgA se řiďte následujícími kritérii:

Tab.5: Bodové hodnocení Ch.trachomatis v soupravě CHLAMYCHECK IgG/IgA

Antigen	Body v IgG	Body v IgA
MOMP	6	6
OMP2	2	3
HSP60	1	3
MIP	3	3

Tab.6: Bodové hodnocení Ch.pneumoniae v soupravě CHLAMYCHECK IgG/IgA

Antigen	Body v IgG	Body v IgA
MOMP	6	6
OMP2	6/4*	4
OMP4	3	4
OMP5	3	4

* 6 bodů, pokud je Ch.trachomatis negativní, v opačném případě 4 body

Tab.7: Bodové hodnocení Ch.psittaci v soupravě CHLAMYCHECK IgG/IgA

antigen	Body v IgG	Body v IgA
MOMP	6/4*	6

* 6 bodů, pokud MOMP Ch.trachomatis a Ch.pneumoniae jsou negativní, jinak 4 body

Tab.8: Hodnocení testu CHLAMYCHECK IgG/IgA

Celkový počet bodů	Hodnocení
≤3	Negativní
4-5	Hraniční
≥6	Pozitivní

11.4 Poznámky k interpretaci výsledků

V některých případech existují silné reaktivity mezi antigeny Chlamydia pneumoniae při použití vzorku séra pozitivního na Chlamydia trachomatis. To může být vyvoláno protilátkami Chlamydia pneumoniae z prodělané infekce v minulosti.

Přítomnost bandu o intenzitě nižší než cut off může vést k podezření na infekci Chlamydia.

Sérologické reakce na infekci Chlamydií jsou často komplexní, protože výskyt infekcí Ch.pneumoniae je silné a křížové reakce protilátek s ohledem na různé druhy Chlamydií důležité. Imunologická odpověď na infekci chlamydií zahrnuje hlavně silné reaktivity s proteinem MOMP. MOMP proteiny se liší v sekvenci aminokyselin. Infekce je možné teoreticky spolehlivě rozlišit pomocí různých druhů chlamydie, hlavně v případě přítomnosti infekce pouze jedním druhem. Přesto jsou pozorovány křížové reakce protilátek proti MOMP. V případě silného výskytu infekcí Chlamydia pneumoniae je interpretace sérologie v případě infekce Chlamydia trachomatis často obtížná. V případě prodělané infekce Chlamydia pneumoniae jsou protilátky proti MOMP Chlamydia trachomatis a Chlamydia pneumoniae přítomny současně.

Reaktivita s ohledem na antigeny *Chlamydia pneumoniae* je způsobena především zbytkovými protilátkami proběhlé infekce v minulosti. Tyto protilátky jsou často zjistitelné při vyšší koncentraci v případě nové infekce *Chlamydia trachomatis*. Reaktivita s ohledem na antigeny *Chlamydia trachomatis* je zřídka pozorována v případě pozitivní sérologie na *Chlamydia pneumoniae* a z klinicky potvrzené infekce *Chlamydií trachomatis*. Antigeny OMP2 jsou také ukazatele užitečné v případě infekce pro *Chlamydie*.

Antigeny OMP2 způsobují vznik protilátek, které jsou na počátku křížové reakce. Je obtížné rozlišit druhy v počáteční fázi infekce na základě imunologických reakcí OMP2. Pokud jsou přítomny protilátky proti OMP2 u *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia pneumoniae* a pokud je přítomen pouze jeden druh protilátky proti MOMP, výsledek je ve prospěch infekce *Chlamydia pneumoniae*. V době infekce *Chlamydia pneumoniae* mohou chybět protilátky proti MOMP, které jsou normální pro případ infekce *Chlamydií trachomatis*.

V mnoha studiích byl podán důkaz, že v přítomnosti typických klinických ukázek infekce *Chlamydia* jsou ve většině případů přítomny protilátky proti Hsp60. Přítomnost protilátky proti Hsp60 může být interpretována jako ukazatel závažnosti nebo chronicity infekce.

V době interpretace chlamydiových infekcí musí být IgG a IgA profily analyzovány paralelně. IgA jsou konkrétnější třída než IgG. Negativní výsledek nevylučuje chlamydiovou infekci. Falešně negativní výsledky se mohou objevit vždy na počátku infekce, kdy se dosud netvoří protilátky proti *Chlamydia trachomatis*.

Při vydávání výsledků musí být vždy brán zřetel na klinické souvislosti a anamnézu.

Tmavé testovací proužky:

Několik pacientských sér může vytvářet tmavé zbarvení na celém nitro-celulózovém stripu (např. séra pacientů s alergií na mléčné bílkoviny). Za toto je odpovědné několik faktorů. Hodnocení těchto proužků je obvykle možné pouze s omezeními. Např. "inverzní" bandy (bílé bandy na tmavém pozadí) jsou hodnoceny jako negativní. Odpovídající sérum by mělo být dotestováno použitím jiných sérologických metod.

12. Klinické výsledky

Produkce protilátek proti *Ch.trachomatis*:

populace	N	specifita	Citlivost
Děti negativní při MIF	10	100% (10/10)	NA
Dospělí negativní při MIF	17	100% (17/17)	NA
Celkem negativní při MIF	27	100% (27/27)	NA
Přímá detekce Ct negativní	14	71,4% (10/14 dle přímé detekce) 100% (14/14 dle MIF)	NA
Čisté MIF IgG Ct	12	NA	67% (8/12)
Přímá detekce Ct pozitivní	46	NA	93,5% (43/46) 100% (46/46)**

** čtení vzhledem ke cut-off

NA – neaplikovatelné

Produkce protilátek proti *Ch.pneumoniae*:

populace	N	specifita	Citlivost
Děti negativní při MIF	10	100% (10/10)	NA
Dospělí negativní při MIF	17	94% (16/17)	NA
MIF negativní celkem	27	96% (26/27)	NA
Čisté MIF IgG Cpn nebo ≥ 512	46	NA	50% (23/46) 100% (46/46)**
Akutní bronchitida	30 sér	1 detekovaná sérokonverze	80% (12/15) 87% (13/15)**

** čtení vzhledem ke cut-off

NA – neaplikovatelné

Produkce protilátek proti Ch.psittaci:

8 patientských sér, u kterých byl očekáván pozitivní nález psitakózy a protilátek proti Ch.psittaci detekovaných pomocí MIF bylo testováno soupravou CHLAMYCHECK IgG/IgA. 4 podaly pozitivní reakci na IgA a IgG spojenou s proteinem MOMP u Ch. psittaci. V tomto případě jsou IgA vysoce specifické. Další 4 séra vykazaly pozitivní reakci u antigenů Ch. trachomatis a Ch. pneumoniae.

13. Potenciálně interferující séra

V průběhu studie o potenciálně rušivých faktorech jako lipemická, ikterická nebo hemolytická séra a přítomnost revmatoidního faktoru, nebyly zaznamenány žádné interference. U těchto sér, obsahujících anti nukleární protilátky, byly zaznamenány IgG rostoucí pozitivní výsledky v oblasti Chlamydia trachomatis a Chlamydia pneumoniae.

V případě infekční mononukleózy probíhá polyklonální stimulace B lymfocytů, což může vést k IgA nespecifické reakci.

Séra pacientů infikovaných bakteriemi Bordetella pertussis, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica, Streptococcus pyogenes, Salmonella spec. nebo virem Parvovirus B19 neprokázala vyšší počet akutních výskytů u protilátek proti Chlamydiím. U patientských sér infikovaných Treponemou pallidum byl zaznamenán vysoký počet pozitivních ve třídě IgG proti Chlamydia trachomatis a Ch. pneumoniae.

14. Literatura

1. K.A.Ault, B.D. Statland, D.I. King MM Dozier, M.L. Joachims und J Gunter: Antibodies to the chlamydial 60 kilodalton heat shock protein in woman with tubal factor infertility. Infect Dis Obstet Gynecol 1998, 6, 163-167
2. M. Askienazy-Elbhar und J.Henry-Suchet: Persistent „silent“ Chlamydia trachomatis female genitaltract infections. Infect Dis Obstet Gynecol 1999, 7, 31-34
3. I.Sziller, S.S. Wittkin, M. Ziegert, Z.Csapo, A.Ujhazy und Z.Papp: Serological responses of patients with ectopic pregnancy to epitopes of the Chlamydia trachomatis 60 kD heat shock protein. Hum Reprod 1998, 13, 1088-1093
4. K.D. Everett, R.M.Bush und A.A.Andersen: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Evol Microbiol 2001, 51 (1), 249, 251-253
5. S.Poppert, R.Marre und A.Essig: Biology and clinical significance of chlamydiae. In A.Schmidt (Ed): Contributions to microbiology, 2001, Vol 8, Karger-Verlag, Basel
6. R.C. Brunham und R.W. Peeling: Chlamydia trachomatis Antigens: Role in Immunity and pathogenesis. Infect Agents Dis 1994, 3(5), 218-233
S.Bas , P. Muzzin, B. Ninet, J.E.Bornand, C. Scieux and T.L. Vischer: Chlamydial Serology: Comparative Diagnostic Value of Immunoblotting, Microimmunofluorescence Test, and Immunoassays Using Different Recombinant proteins as Antigens: J Clin Microbiol 2001, 39(4), 1368-1377
7. K.Knudsen, A.s. Madsen, P.Mygind, G.Christiansen und S. Birkelund: Identification of two Novel genes Encoding 97- to 99- Kilodalton Outer Membrane proteins of Chlamydia pneumoniae. Infect. Immun. 1999, 67 (1), 375-383
8. G.Wagels, S.Rasmussen und P.Timms: Comparison of Chlamydia pneumoniae Isolates by Western Blot (Immunoblot) Analysis and DNA Sequencing of the omp 2 gene. J Clin Microbiol 1994, 32 (11), 2820-2823
9. Y. Lijima, N.Miyashita, T. Kishimoto, Y. Kanamoto, R. Soejima und A. Matsumoto: Characterization of Chlamydia pneumoniae Species-Specific Proteins Immunodominant in Humans. J Clin Microbiol 1994, 32 (3), 583-588
10. A.J.Littman, L.A. Jackson, E.White, M.D. Thornquist, C.A.Gaydos und T.L.Vaughan: Interlaboratory Reliability of Microimmuno-fluorescence test for Measurements of Chlamydia pneumoniae-Specific Immunoglobulin A and G Antibody Titers. Clin.Diagn. Lab. Immunolo. 2004, 11(3), 615-617

15. Kontakty na dodavatele:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 532/78 b, 612 00 Brno, Česká republika

T: + 420 541 243 113, F: + 420 541 243 114, M: + 420 737 245 070

email: objednavky@laboserv.cz , laboserv@laboserv.cz, <http://www.laboserv.cz>