

# GeneProof®

*Chlamydia pneumoniae*

PCR Kit

CE

*in vitro* Diagnostics

Souprava je určena pro profesionální použití ve specializovaných klinických a výzkumných laboratořích.

## Složení soupravy

Cat. No.	Interní standard je součástí MasterMixu pro kontrolu inhibice			Obsahuje interní standard samostatně pro kontrolu inhibice a izolačního procesu		
	CHP/ISIN/025 25 reakcí	CHP/ISIN/050 50 reakcí	CHP/ISIN/100 100 reakcí	CHP/ISEX/025 25 reakcí	CHP/ISEX/050 50 reakcí	CHP/ISEX/100 100 reakcí
<b>MASTERMIX</b> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl
<b>POSITIVE CONTROL</b> <i>Chlamydia pneumoniae</i> 10 <sup>2</sup> copies/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	2 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	2 x 200 µl
<b>INTERNAL STANDARD</b> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	-	-	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl

## Podmínky skladování a přepravy

Souprava je doporučeno přepravovat při teplotách v rozmezí -20 °C až -80 °C. Souprava je stabilní při teplotě -20°C 9 měsíců od data výroby. Opětovné zmrazování a rozmrazování MasterMixu, Interního standardu anebo Pozitivní kontroly může vést ke snížení kvality detekce. Výrobce proto doporučuje připravený MasterMix rozalíkovat po 30 µl přímo do PCR zkumavek a takto skladovat při -20 °C. Pozitivní kontrolu a interní standard je možné skladovat při 4 °C.

## Informace o patogenu

*Chlamydia pneumoniae* je intracelulární respirační patogen, vyvolávající především chronické bronchitidy, „atypické“ pneumonie a sinusitidy. Infekce jsou v populaci běžné a ve věku 50 let je 70 % populace seropozitivní. Přenáší se kapénkovou infekcí většina populace se nakazí již v dětství. Infekce bývají v až 70 % případů asymptomatické a v průběhu života se mohou opakovat. Akutní i chronické infekce respiračního traktu mají vztah k aktivaci bronchiálního astmatu. U starších lidí je to jeden z patogenů (vedle infekcí *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*), způsobujících závažná chronická obstruktivní plicní onemocnění vyznačující se symptomy jako zvýšený objem sputa, zvýšená purulence sputa a dyspnoea. Infekce respiračního traktu bývají po akutní fázi často chronické s perzistujícími symptomy špatně reagujícími na ATB terapii. U dětí do 5 let věku infekce *C. pneumoniae* souvisejí se sýravostí a při zanedbání mohou vyústit do závažnějších respiračních onemocnění. Perzistující chlamydie bývají přítomny i v synoviální tekutině pacientů s kloubními onemocněními. Infekce je také častou komplikací autoimunitních očních a revmatických onemocnění, souvisejících s přítomností alely HLA-B27 (konjunktivitis, uveitis, reaktivní artritida). Interpretace sérologických diagnostických metod může být z důvodu vysoké seroprevalence v populaci a možné asymptomatické persistenci. Proto je vhodné v diagnostice aktivní infekce využít přímého průkazu infekčního agens metodou PCR, detekujícího patogena v jakýchkoliv klinických materiálech.

## Princip metody

PCR kit je určen pro detekci *Chlamydia pneumoniae* metodou real-time polymerázové řetězové reakce (real-time PCR). Detekce *C. pneumoniae* je založena na principu amplifikace specifické konzervativní sekvence DNA jednokopiového genu *ompA* a měření nárůstu koncentrace amplifikačního produktu v průběhu PCR pomocí fluorescenčně značené sondy. Přítomnost *C. pneumoniae* je indikována nárůstem fluorescence FAM fluoroforu. V reakční směsi je zabudován interní standard (IS), kontrolující možnou inhibici PCR reakce, eventuálně účinnost DNA izolačního procesu. Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro JOE fluorofor. Detekční souprava využívá technologii „hot start“ minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální senzitivitu a obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) kontrolující možnou kontaminaci PCR reakce amplifikačními produkty. Citlivost diagnostické soupravy je v jednotkách genomu chlamydií na PCR reakci. To umožňuje velmi vysokou citlivost laboratorní detekce *C. pneumoniae* v klinickém materiálu. Kit je určen pro *in vitro* diagnostiku a umožňuje kvalitativní detekci.

PCR soupravy firmy GeneProof jsou konstruovány tak, aby je bylo možno používat na real-time přístrojích různých výrobců. *Chlamydia pneumoniae* PCR Kit byl validován na následujících přístrojích:

Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Life Science)  
Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science)  
7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)  
LightCycler® 2.0 (Roche)  
LightCycler® 480 System (Roche)  
SLAN Real-time Quantitative PCR Fluorescent Detection System (Shanghai Odin Scienc & Technology Co.)

Podrobné informace o použití PCR kitů na konkrétních přístrojích naleznete na [www stránkách výrobce](http://www.geneproof.com) ([www.geneproof.com](http://www.geneproof.com)) anebo si je vyžádejte u dodavatele souprav.

Pro použití soupravy na jiných real-time přístrojích kontaktujte prosím výrobce: [support@geneproof.com](mailto:support@geneproof.com)

### Upozornění:

- Souprava je vyrobena v souladu s evropskou Směrnicí Rady 98/79/ES jako diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*.
- Při manipulaci s pozitivní kontrolou nebo při práci s klinickým materiálem dbejte zvýšené opatrnosti, při nesprávné manipulaci by mohlo dojít ke kontaminaci a tím ke znehodnocení složek soupravy nebo MasterMixu! Za znehodnocení soupravy nesprávnou manipulací nebo skladováním výrobce neručí.
- Soupravu je po použití doporučeno likvidovat podle aktuální právní úpravy s ohledem na skutečnost, že souprava neobsahuje žádné nebezpečné, infekční nebo toxické látky, které by podléhaly zvláštním bezpečnostním předpisům a použité obalové materiály jsou vyrobeny z papíru a z polypropylenu.

## Návod k použití

### Odběr a uchovávání vzorků

Pro detekci *Chlamydia pneumoniae* se odebírají vzorky sputa, BALu, výtěry nasopharyngu, výtěry z nosní sliznice, stěry rohovky, tkáně, velmi informativní je také vyšetření vzorku periferní krve (chlamydie se při infekcích v periferní krvi vyskytují) a synoviální tekutiny u pacientů s artritidou. Odběr všech typů vzorků kromě krve je nutno provést do sterilní zkumavky bez transportního média a transportovat do 12 hodin při +4 °C. Je třeba odebrat cca 1 ml vzorků tělních tekutin; stěr nebo výtěr na tampónu „na sucho“. Odběr krve: vzorek nesrážlivé periferní krve se odebírá do EDTA a transportuje při +4 °C do 24h do laboratoře. Při delším skladování je potřeba všechny vzorky uchovávat zamražené při -20 °C.

### DNA izolace

Izolaci DNA je možno provádět na trhu dostupnými izolačními soupravami dle příslušných protokolů pro izolaci příslušného mikroorganismu. Výrobce doporučuje následující izolační soupravy: PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof).

Všechny PCR kity GeneProof obsahují interní standard (IS), pomocí kterého je možné účinně sledovat možné inhibice v průběhu PCR amplifikace a případně také účinnost izolačního procesu. Interní standard je přesně definovaný a kvantifikovaný konstrukt plasmidu a insertu připravený cestami genového inženýrství. Společnost GeneProof vyvíjí a prodává dvě základní varianty PCR kitu, které se liší kompozicí interního standardu:

#### PCR Kit ISIN (Cat. No. CHP/ISIN...)

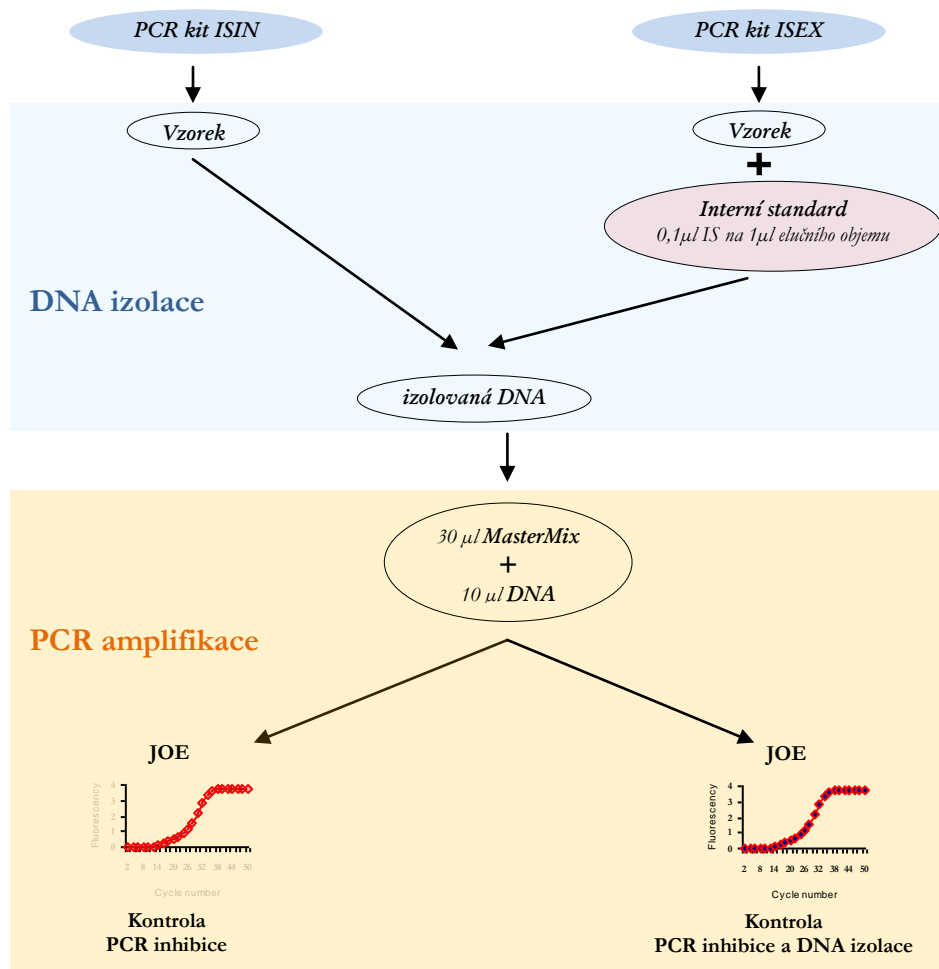
V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přímo součástí zkumavky s MasterMixem. Tato varianta kitu umožňuje účinnou kontrolu inhibice PCR reakce.

#### PCR Kit ISEX (Cat. No. CHP/ISEX...)

V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přiložen jako samostatná součást balení. Tuto variantu PCR kitu lze využít jak ke kontrole inhibice PCR reakce, tak i ke kontrole účinnosti izolace DNA.

Při použití ISEX varianty PCR kitů je IS přidáván přímo ke vzorku na počátku izolačního procesu tak, aby na 1 µl výsledného elučního objemu připadlo 0,1 µl IS:

Eluční objem	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Interní standard	2,5 µl	5 µl	10 µl	20 µl



## PCR amplifikace

1. Do zkumavky přidat **30 µl MasterMixu** a **10 µl izolátu DNA** nebo **10 µl Pozitivní kontroly**. Výsledný objem reakční směsi je 40 µl.
2. Zkumavky uzavřít, krátce centrifugovat, vložit do přístroje a programovat dle schématu:

### Amplifikační program:

UDG dekontaminace	37 °C/2 min.
počáteční denaturace	95 °C/10 min.
denaturace	95 °C/5 sec.
annealing	60°C/ 40 sec. – čtení fluorescenčního signálu
extenze	72°C/ 20 sec.
počet cyklů	45

## Kvalitativní vyhodnocení detekce

