

Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac

Deutsch/English/Français



HERSTELLER/MANUFACTURER/FABRICANT

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

VERTRIEB/MARKETING/DISTRIBUTION

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Telefon/Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 348
Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 359

**BESTELLADRESSE/ORDERING ADDRESS/
ADRESSE DE COMMANDE**

Telefon/Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 111
Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 113

Deutsch: S. 1
English: p. 16
Français: p. 30

Literatur/References/Littérature: S./p./p. 44

Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgM-Antikörpern
gegen **Chlamydia pneumoniae**

Katalog-Nr.: 432/TMB

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

Chlamydien gehören zu den gramnegativen Bakterien. Sie leben intrazellulär in den Epithelien von Schleimhäuten, Endothelien, glatten Muskelzellen der Gefäße sowie nach neueren Erkenntnissen auch in bestimmten Gewebsstrukturen des Zentralnervensystems.

Chlamydien sind auf energiereiche Phosphate der Wirtszelle angewiesen und werden daher auch als Energieparasiten bezeichnet.

Die Gattung Chlamydia umfaßt die folgenden vier Arten: **C. trachomatis**, **C. pneumoniae**, **C. psittaci** und **C. pecorum**.

C. trachomatis und **C. pneumoniae** sind ausschließlich humanpathogen. **C. psittaci** ruft beim Menschen und einer Vielzahl von Tieren Infektionen hervor. **C. pecorum** wurde bisher nur bei Tieren nachgewiesen.

C. pneumoniae ist weltweit verbreitet. Zusätzlich zu grippalen Infekten beinhaltet das Krankheitsspektrum Sinusitis, Pharyngitis, Bronchitis, chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen, atypische Pneumonien und reaktive Arthritis. Eine ursächliche Beteiligung an infektionsbedingtem Asthma, Sarkoidose, Lungenkrebs, Atherosklerose, akutem Myokardinfarkt, Schlaganfall, Multipler Sklerose und Spätformen der Alzheimer Krankheit wird aktuell diskutiert.

Nach Grayston und Saikku (1989), den Erstbeschreibern dieser Chlamydienart, macht fast jeder Mensch in seinem Leben wiederholt **C. pneumoniae**-Infektionen durch. Der überwiegend schwach und/oder diffus symptomatische Verlauf von **C. pneumoniae**-Infektionen erschwert deren Entdeckung, so dass sich chronische Krankheitsverläufe mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen entwickeln können.

Die Prävalenz von **C. pneumoniae**-Infektionen wird im Vorschulalter auf unter 10% geschätzt, mit einem steilen Anstieg auf 50% jenseits des 20. Lebensjahres, bis hin zu 80 - 100% jenseits von 70 Jahren.

Die Diagnostik von ***C. pneumoniae***-Infektionen basiert auf direktem Erreger-/Antigen-/Nukleinsäurenachweis und der Serologie.

Die Anzucht des Erregers aus Abstrichmaterial, die über mehrere Passagen verläuft, ist zeitaufwendig, Speziallaboren vorbehalten und nur in wenigen Fällen erfolgreich. Direkte Immunfluoreszenz und Antigen-ELISA werden aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität nur selten eingesetzt. Eine kommerzielle, standardisierte PCR oder LCR steht noch nicht zur Verfügung.

Aufgrund der Unzulänglichkeiten von kulturellen und nicht kulturellen Erreger-/Antigennachweisen zur Diagnose von ***C. pneumoniae***-Infektionen wird die Serologie als Methode der Wahl angesehen.

Als sogenannter „Goldstandard“ in der artspezifischen Serologie gilt bislang die Mikroimmunfluoreszenz (MIF). Bei der MIF handelt es sich um einen aufwendigen, subjektiv auszuwertenden Test, der viel Erfahrung erfordert. Die MIF ist nicht standardisiert. Verschiedene Antigenpräparationen und unterschiedliche Cut-off-Kriterien für abgelaufene, kürzlich erfolgte oder akute Infektionen führen zu signifikanten Unterschieden in den Ergebnissen von Labor zu Labor.

Der ***Chlamydia pneumoniae*-sELISA medac** arbeitet mit einem hochaufgereinigten und spezifischen Antigen. Der Nachweis von IgM-, IgA- und IgG-Antikörpern gegen ***C. pneumoniae*** erlaubt eine Abklärung des Infektionsstatus und des Therapieverlaufs. IgM-Antikörper gegen ***C. pneumoniae*** signalisieren mit großer Sicherheit eine akute Infektion.

Der ***Chlamydia pneumoniae*-sELISA medac** entspricht den Bedürfnissen nach Standardisierung, Objektivität, Reproduzierbarkeit und Automatisierung in Routinelaboren.

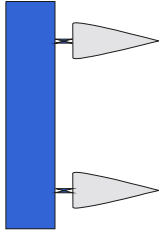
Außer dem

Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac
Kat.-Nr.: **432/TMB** für 96 Bestimmungen

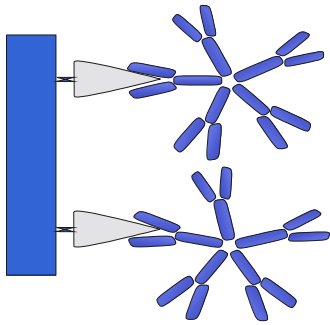
führen wir unter anderem die folgenden Produkte:

Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac
Kat.-Nr.: **430/TMB** für 96 Bestimmungen,
Chlamydia pneumoniae-IgA-sELISA medac
Kat.-Nr.: **431/TMB** für 96 Bestimmungen,
Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac
Kat.-Nr.: **497/TMB** für 96 Bestimmungen,
Chlamydia trachomatis-IgA-pELISA medac
Kat.-Nr.: **498/TMB** für 96 Bestimmungen,
Chlamydien-IgG-rELISA medac
Kat.-Nr.: **480/TMB** für 96 Bestimmungen,
Chlamydien-IgA-rELISA medac
Kat.-Nr.: **490/TMB** für 96 Bestimmungen,
Chlamydien-IgM-rELISA medac
Kat.-Nr.: **485/TMB** für 96 Bestimmungen,
cHSP60-IgG-ELISA medac
Kat.-Nr.: **435** für 96 Bestimmungen.

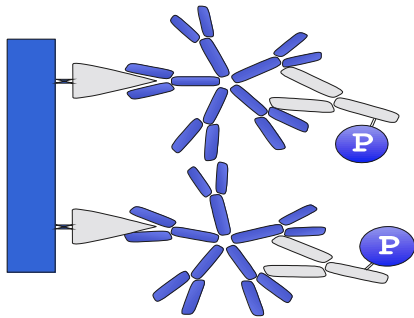
TESTPRINZIP



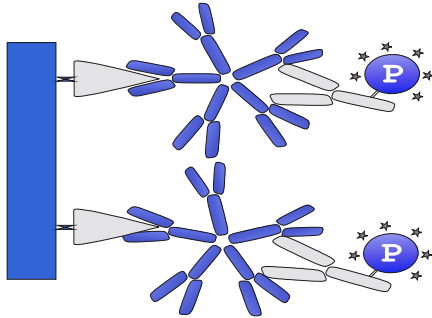
Mit *C. pneumoniae*-spezifischem Antigen beschichtete Mikrotiterplatte.



Die *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörper aus dem Patientenserum binden an das Antigen.



Das Peroxidase-gekoppelte Anti-Human-IgM bindet an die IgM-Antikörper (P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

Testvorteile

- ☞ Hohe Sensitivität und Spezifität.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.

PACKUNGSINHALT

KAT.-NR. : 432/TMB

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, pink markiert (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit **C. pneumoniae**-spezifischem Antigen und FKS, gebrauchsfertig.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält NBCS, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/NBCS, pH 7,0-7,2, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält ProClin™ 300.
6.

CON

Konjugat: 4 Fläschchen à 5,0 ml, Ziege-Anti-Human-IgM-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, rot gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
7.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
8.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 14 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.
9.

RF-ABS

IgG/Rf-Absorbens: 1 Fläschchen à 4 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antiserum, gebrauchsfertig, enthält Natriumazid < 0,1%.

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Testkit	ungeöffnet	2 - 8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2 - 8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	12 Wochen
Kontrollen	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2 - 8 °C	12 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Konjugat	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
TMB-Substrat	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2 - 8 °C	bis Verfalldatum
IgG/Rf-Absorbens	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H₂O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 nm - 650 nm.

3. ANSETZEN DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme von Mikrotitervertiefungen zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe unter Punkt 1.

3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10 x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10 x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

Evtl. im Waschpuffer (10 x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen. Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat, IgG-Rf-Absorbens und Stopplösung für alle Chlamydia- und Mycoplasma-ELISA medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum, jedoch nicht für Plasma.

4.2. Um Interferenzen mit hohen IgG-Titern und Rheumafaktoren zu vermeiden, soll eine IgG-/Rheumafaktor-Absorption für alle Seren durchgeführt werden.

4.3. Eine zusätzliche Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich. Sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.

5. ARBEITSVORSCHRIFT

5.A. IgG/Rf-ABSORPTION

Wichtig:

- * **Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und werden nicht absorbiert.**
- * **Die im folgenden angegebenen Volumina gelten pro Einzelbestimmung.**

5.A.1. Serum: 10 µl Serum werden mit 240 µl Verdünnungspuffer verdünnt (Verdünnung 1:25).

5.A.2. Absorption: 30 µl IgG/Rf-Absorbens und 30 µl verdünntes Serum werden gemischt (Verdünnung 1:50) und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Alternative: Die Absorption kann auch über Nacht bei 2 - 8°C durchgeführt werden.

5.A.3. Die Testverdünnung ist nun 1:50.

5.B. TESTDURCHFÜHRUNG

5.B.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

5.B.2. Für die Ermittlung des Leerwertes in die Vertiefung A1 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettieren (s. 6.A.). Anschließend in Doppelbestimmung jeweils 50 µl negative Kontrolle, dann in Einfachbestimmung die positive Kontrolle (50 µl), sowie fortlaufend auch in Einfachbestimmung die verdünnten Patientenproben (50 µl) pipettieren.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer für maximal 30 min bei RT gelagert werden.

5.B.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).

5.B.4. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefun-

gen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

5.B.5. Konjugat (rot gefärbt) in alle Vertiefungen pipettieren.

Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 µl Konjugat pro Vertiefung pipettiert.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl Konjugat pro Vertiefung zu programmieren.

Die grundsätzliche Eignung des Testes für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystem zu verifizieren.

5.B.6. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).

5.B.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.B.4.).

5.B.8. 50 µl TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren und 30 min (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.

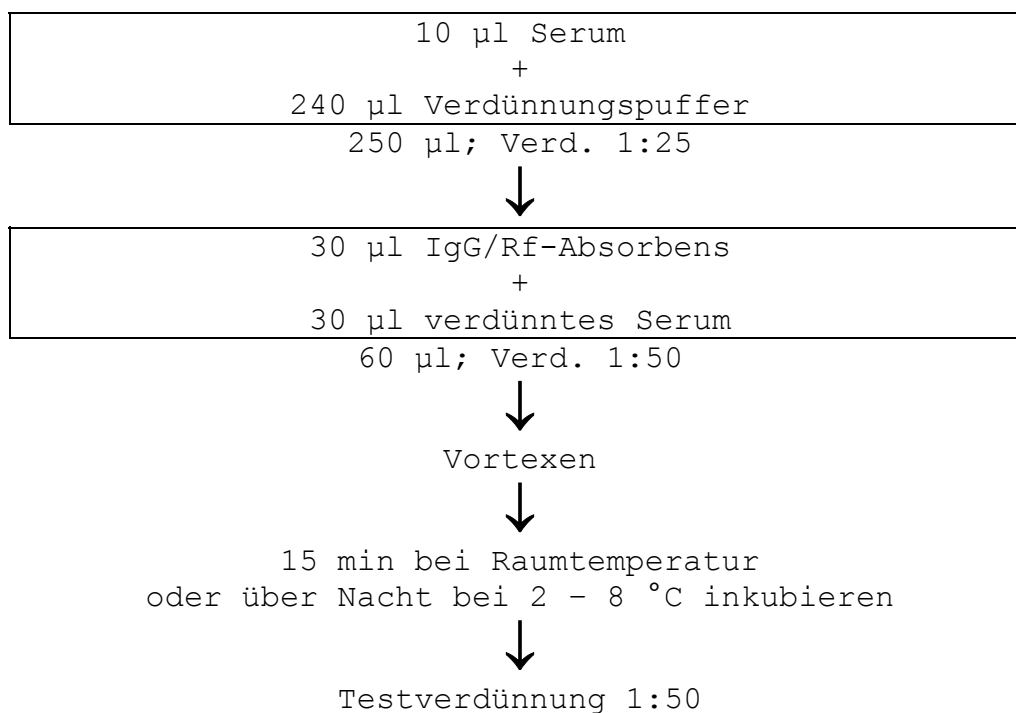
5.B.9. Durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind!

Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen!

5.C. TABELLE ZUR IgG/RF-ABSORPTION

Angaben pro Bestimmung



5.D. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Probe
Probenverdünnungspuffer	50 µl	-	-	-
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
Absorbierte Probe	-	-	-	50 µl
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
Konjugat	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren				
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620 - 650 nm)				

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.B.5.)

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 - 650 nm).
- * Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.
- * Der OD-Wert des Leerwertes muß **< 0,100** betragen.
- * Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß **< 0,100** betragen.
- * Der OD-Wert der **positiven Kontrolle** muß **> 0,800** betragen.
- * **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,380**
- * **Grenzbereich = Cut-off ± 10%**

6.B. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

6.B.1. QUALITATIV

Ergebnis	Bewertung
OD < Grenzbereich	negativ
OD des Cut-off +/- 10%	grenzwertig
OD > Grenzbereich	positiv

6.B.2. QUANTITATIV

Cut-off-Index: $\frac{\text{OD der Probe}}{\text{OD des Cut-off}}$	Bewertung
< 0,9	negativ
0,9 - 1,1	grenzwertig
> 1,1	positiv

- * Werte im Grenzbereich sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.

- * Die Testergebnisse sollten stets in Verbindung mit IgG und IgA und im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.
- * Hohe Hämoglobin- und Bilirubinkonzentrationen im Serum beeinflussen die Testergebnisse nicht. Dagegen können hohe Lipidkonzentrationen bei negativen Proben zu erhöhten OD-Werten führen.
- * Kreuzreaktionen mit antinukleären Antikörpern, heterophilen Antikörpern sowie *C. psittaci*- und *C. trachomatis*-Antikörpern sind in Einzelfällen nicht auszuschließen.

6.C. SPEZIFISCHE IgM-INTERPRETATION

Mögliche Ergebnisse IgM	Interpretation
+	1. Anzeichen einer akuten Infektion.
+/-	2. IgM im Graubereich; Möglichkeit eines sehr frühen Stadiums einer akuten Infektion. Überprüfung des IgM nach 10 - 14 Tagen und Testung auf IgA und IgG.
-	3. Negativ im Hinblick auf Anti- <i>Chlamydia pneumoniae</i> -IgM-Antikörper. Bei begründetem klinischen Verdacht Testung auf IgA und IgG.

Hinweis:

Bei frischen, akuten *Chlamydia pneumoniae*-Infektionen kann der serologische Antikörperbefund trotz Klinik und positivem Erregernachweis negativ ausfallen. Bei Wunsch nach serologischer Bestätigung eines positiven Erregernachweises bzw. einer Verlaufskontrolle empfehlen wir, nach 14 Tagen auf Serokonversion zu testen.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

7.A. SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT

Zur **Ermittlung der Spezifität** wurden insgesamt 121 *C. pneumoniae* MIF IgM negative Seren (31 Patienten mit Verdacht auf eine Chlamydieninfektion (1) und 90 Patienten, kulturpositiv für *C. trachomatis*, aus einer STD-Sprechstunde(2) sowie 159 IgM negative Seren (3) (Referenz-ELISA) von Blutspendern (Männer und Frauen im Alter zwischen 20 und 60 Jahren) gemessen.

Zur **Ermittlung der Sensitivität** wurden 38 Seren von Patienten mit Atemwegserkrankungen (4) gemessen. In allen Seren waren in der MIF IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae* nachweisbar.

Probandengruppe	Spezifität IgM
Seren ohne IgM-Antikörper gegen <i>C. pneumoniae</i> in der MIF: (1) Patienten mit Verdacht auf eine Chlamydieninfektion (n=31) (2) STD-Patienten (n=90) <i>C. pneumoniae</i> IgM negative Seren (Referenz-ELISA): (3) Blutspender (n=159)	90% (28/31) 98% (88/90) 99% (157/159)
Probandengruppe	Sensitivität IgM
Seren mit IgM-Antikörpern gegen <i>C. pneumoniae</i> in der MIF: (4) Patienten mit Atemwegserkrankungen (n=38)	97% (37/38)

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	Ø OD	S	VK (%)	n		Ø OD	S	VK (%)
NK	0,036	0,003	9	21	NK	0,035	0,003	10
GW	0,503	0,027	5	21	GW	0,521	0,027	5
PK	1,216	0,047	4	21	PK	1,225	0,063	5
Nr. 1	0,844	0,063	7	21	Nr. 3	0,051	0,004	9
Nr. 2	0,719	0,042	6	21	Nr. 4	0,848	0,061	7

NK = negative Kontrolle; GW = schwach positive Kontrolle (im Kit nicht enthalten); PK = positive Kontrolle

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- * Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- * Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien, wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

Ausgabedatum: 20.08.2004

Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac

Enzyme immunoassay for the detection of IgM antibodies
to **Chlamydia pneumoniae**

Cat.no.: 432/TMB

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTRODUCTION

Chlamydiae are gram-negative bacterial pathogens. They have an obligate intracellular life cycle in mucosal surfaces, endothelial cells, smooth muscle cells, and according to recent findings in certain tissue structures of the central nervous system. Chlamydiae depend on energy-rich phosphates of their host cells and are therefore energy parasites.

The genus chlamydia comprises four species: **C. pneumoniae**, **C. trachomatis**, **C. psittaci**, and **C. pecorum**. **C. pneumoniae** and **C. trachomatis** are obligate pathogens of humans. **C. psittaci** is pathogenic for humans and a variety of animal species. To date, **C. pecorum** has been isolated from animals only.

Infections with **C. pneumoniae** occur worldwide. The spectrum of diseases, in addition to flu-like illness, includes sinusitis, pharyngitis, bronchitis, chronic obstructive pulmonary diseases, pneumonia, and reactive arthritis. A causal involvement of **C. pneumoniae** in infectious asthma, sarcoidosis, lung cancer, atherosclerosis, acute myocardial infarction, brain stroke, multiple sclerosis, and late onset of Alzheimer's disease remains an area of actual investigation.

According to Grayston and Saikku (1989), who firstly had described this chlamydia species, almost everybody is infected and reinfected with **C. pneumoniae** throughout his life. The mainly weak and/or diffuse symptomatic course of **C. pneumoniae** infections makes their detection more difficult; undetected infections may lead to chronic courses of disease with serious sequelae.

The prevalence of **C. pneumoniae** infections has been estimated at less than 10% in children not yet attending school, followed by a strong increase to 50% beyond the age of 20 years and up to 80-100% beyond the age of 70 years.

The diagnosis of *C. pneumoniae* infections is based upon isolation of the pathogen from cell culture, direct antigen detection, nucleic acid amplification tests, and serology.

Isolation of the pathogen from cell culture normally needs various subsequent passages; it is time consuming, restricted to special laboratories, and only in few cases successful. Direct immunofluorescence assays (IFA) and antigen enzymeimmunoassays (EIA) have not been widely used; they have been reported to be of low sensitivity and also specificity. A commercially PCR or LCR, to date, are not available.

The shortcomings of culture and non-culture methods for the diagnosis of *C. pneumoniae* infections have made serology the method of choice.

For the detection of species-specific antibodies the microimmunofluorescence (MIF) has been considered as the "gold standard". MIF is laborious, subjective, and requires much experience. This test system is not standardized; the use of different antigens and different cut-off criteria for past and recent or current infections creates significant lab-to-lab variations of results.

The **Chlamydia pneumoniae-sELISA medac** employs a highly purified and specific antigen. The detection of IgM, IgA, and IgG antibodies allows the appraisal of the infection's status and the follow up after treatment. IgM antibodies indicate with a high degree of sureness an acute infection.

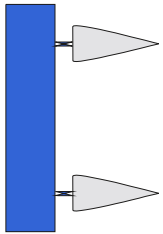
The **Chlamydia pneumoniae-sELISA medac** fulfills the needs for standardization, objectivity, reproducibility, and automation in the routine laboratory.

In addition to the **Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac**
Cat.no.: **432/TMB** for 96 determinations

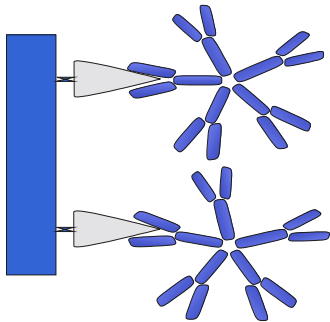
we also distribute the following products:

Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac
Cat.no.: **430/TMB** for 96 determinations,
Chlamydia pneumoniae-IgA-sELISA medac
Cat.no.: **431/TMB** for 96 determinations,
Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac
Cat.no.: **497/TMB** for 96 determinations,
Chlamydia trachomatis-IgA-pELISA medac
Cat.no.: **498/TMB** for 96 determinations,
Chlamydia-IgG-rELISA medac
Cat.no.: **480/TMB** for 96 determinations,
Chlamydia-IgA-rELISA medac
Cat.no.: **490/TMB** for 96 determinations,
Chlamydia-IgM-rELISA medac
Cat.no.: **485/TMB** for 96 determinations,
CHSP60-IgG-ELISA medac
Cat. no.: **435** for 96 determinations.

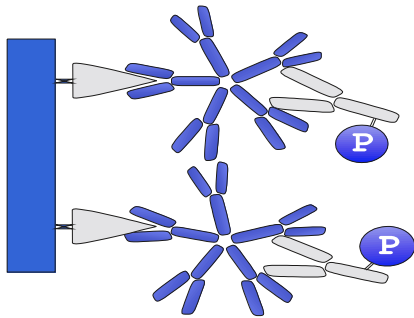
TEST PRINCIPLE



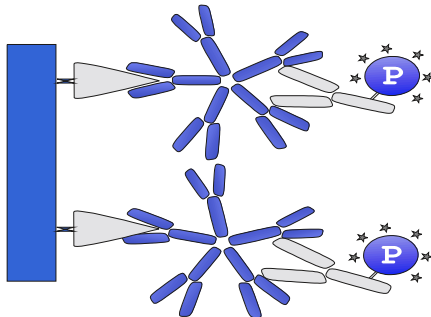
The plate is coated with a highly purified *C. pneumoniae*-specific antigen preparation.



The *C. pneumoniae*-specific antibodies from the specimen bind to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgM antibodies bind to the IgM antibodies (P=peroxidase).



Incubation with TMB-substrate (*). The reaction is stopped by the addition of sulfuric acid. The absorption is read photometrically.

Advantages of the test

- ☞ High sensitivity and specificity.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 432/TMB

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells, pink-coded (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with **C. pneumoniae**-specific antigen and FCS, ready to use.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, stained blue, contains NBCS, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, stained blue, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
4.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml PBS/Tween (10 x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml PBS/Tween/NBCS, pH 7.0 - 7.2, ready to use, stained blue, contains ProClin™ 300.
6.

CON

Conjugate: 4 vials with 5.0 ml each, goat anti-human IgM, HRP-conjugated, ready to use, stained red, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
7.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
8.

STOP

Stop solution: 2 vials with 14 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.
9.

RF-ABS

IgG/Rf-absorbent: 1 vial with 4 ml, goat anti-human IgG antibody, ready to use, contains < 0.1% sodium azide.

1. STORAGE AND STABILITY

MATERIAL/REAGENT	STATE	STORAGE	STABILITY
Test kit	unopened	2 - 8 °C	until expiry date
Microplate	opened	2 - 8 °C in bag with desiccant	12 weeks
Controls	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Wash buffer	diluted	2 - 8 °C	12 weeks
Sample diluent	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Conjugate	opened	2 - 8 °C	12 weeks
TMB-substrate	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Stop solution	opened	2 - 8 °C	until expiry date
IgG/Rf-absorbent	opened	2 - 8 °C	12 weeks

Do not use the reagents after the expiry date.

2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 2.1. Water for injection (H₂O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of wash buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

3. PREPARATION OF THE REAGENTS

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature (RT).

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

After each removal of wells the aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant. Storage and stability of the wells are indicated under point 1.

3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (10 x) with nine volumes of water for injection (e.g. 50 ml wash buffer (10 x) with 450 ml water). 10 ml of diluted wash buffer are needed for eight wells.

Crystals in the wash buffer (10 x) have to be dissolved by warming (max. 37 °C) and/or stirring at RT.

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, conjugate) from different kit lots. In contrast to that, sample diluent, wash buffer, TMB-substrate, IgG/Rf-absorbent and stop solution are generally exchangeable in all Chlamydia-and Mycoplasma-ELISA medac.

Reagents from other manufacturers must not be used in general.

Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed.

4. SPECIMEN

- 4.1. The test is suitable for serum samples, but not for plasma.
- 4.2. In order to avoid interferences with high IgG titers and rheumatoid factors (RF) an absorption of IgG/RF shall be performed.
- 4.3. An additional pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain red blood cells.

5. TEST PROCEDURE

5.A. IgG/RF-ABSORPTION

Attention:

- * **The controls are ready to use (no absorption necessary).**
- * **The following volumes indicated apply for single determinations only.**

- 5.A.1. Serum: 10 µl serum are diluted with 240 µl sample diluent (dilution 1:25).

5.A.2. Absorption: 30 µl IgG/Rf-Absorbent and 30 µl diluted serum are mixed (dilution 1:50) and incubated for 15 min at room temperature.

Alternative: The absorption can be performed overnight at 2 - 8 °C.

5.A.3. Now the test dilution is 1:50.

5.B. TEST RUN

5.B.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

Microplate wells are ready to use and do not have to be prewashed.

5.B.2. Pipette 50 µl of the sample diluent into the well A1 as blank (see 6.A.), and 50 µl of the negative control (in duplicate), positive control, and the diluted patient samples.

If necessary the microplate wells can be kept for max. 30 min in a humid chamber at RT before proceeding.

5.B.3. Incubate the microplate wells for 60 min (± 5 min) at 37 °C (± 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.B.4. After incubation wash the microplate wells three times with 200 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing tap microplate wells on filter paper.

Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!

5.B.5. Add conjugate (coloured red) to each well.

50 µl of conjugate have to be pipetted into the wells if the test is done manually.

Please note:

When working with automated devices, 60 µl of conjugate have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the devices.

The suitability of the test for automated devices was confirmed during the evaluation of the test. Nevertheless we re-

commend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.

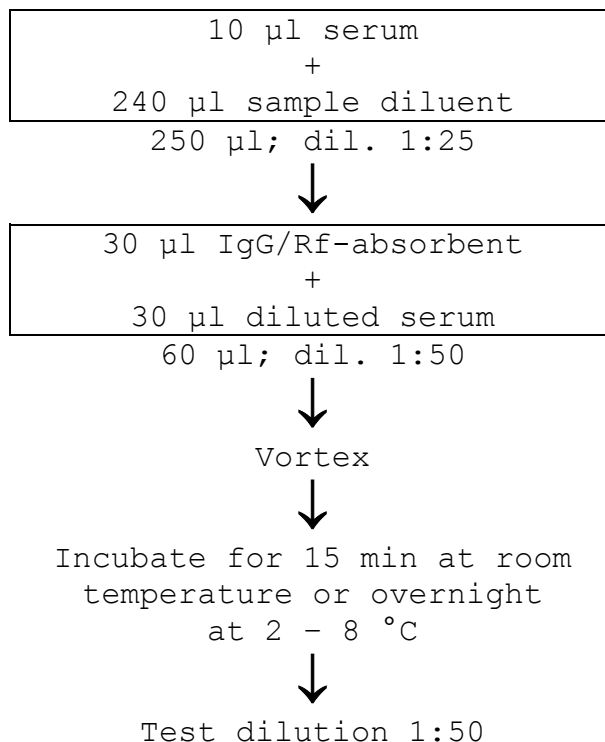
- 5.B.6. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.
- 5.B.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.B.4.).
- 5.B.8. Add 50 μ l of TMB-substrate to each well and incubate for 30 min (\pm 2 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.
- 5.B.9. Stop the reaction by adding 100 μ l of stop solution to each well. Positive samples turn yellow.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading should be done within 15 min after adding the stop solution!

5.C. TABLE FOR THE IgG/RF-ABSORPTION

Indication per determination



5.D. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Sample
Sample diluent	50 µl	-	-	-
Negative control	-	50 µl	-	-
Positive control	-	-	50 µl	-
Absorbed sample	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer.				
Conjugate	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer.				
TMB-substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark.				
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)				

*) manual/automatic procedure (see 5.B.5.)

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- * Read OD values at 450 nm (reference wavelength 620 - 650 nm).
- * Subtract the OD value of the blank (well A1) from all other OD values.
- * The OD value of the blank has to be **< 0.100**.
- * The mean OD value of the **negative control** has to be **< 0.100**.
- * The OD value of the **positive control** has to be **> 0.800**.
- * **Cut-off = mean OD value of the negative control + 0.380**
- * **Grey zone = Cut-off ± 10%**

6.B. EVALUATION OF RESULTS:

6.B.1. QUALITATIVE

Result	Valuation
OD < Grey zone	negative
OD of Cut-off +/- 10%	equivocal
OD > Grey zone	positive

6.B.2. QUANTITATIVE

Cut-off-Index: $\frac{\text{OD Sample}}{\text{OD Cut-off}}$	Valuation
< 0.9	negative
0.9 - 1.1	equivocal
> 1.1	positive

- * Samples with OD values within the grey zone should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.
- * The results should always be interpreted in connection with IgG and IgA, and with the clinical data and additional diagnostic parameters.
- * High concentrations of hemoglobin and of bilirubin in serum do not have an influence on the results.
- * However, high concentrations of lipids might increase the OD values of negative samples.
- * Cross-reactivities with antinuclear antibodies, heterophilic antibodies and antibodies to *C. psittaci* as well as to *C. trachomatis* cannot be excluded in individual cases.

6.C. SPECIFIC IgM INTERPRETATION

Possible Results	Interpretation
+	1. Indication of an acute infection.
+/-	2. IgM greyzone. Possibility of a very early stage of an acute infection. Retest IgM after 10 - 14 days and test for IgA and IgG.
-	3. Negative with respect to anti- <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgM antibodies. In cases of justified clinical suspicion test for IgA and IgG.

Comment:

In cases of fresh acute ***Chlamydia pneumoniae*** infections the serological antibody results may be negative despite clinical symptoms and positive antigen detection. If a serological confirmation of a positive antigen result or if a follow up is desired we recommend to test after 14 days for seroconversion.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

7.A. SPECIFICITY AND SENSITIVITY

121 sera IgM negative by MIF to ***C. pneumoniae*** (31 patients with clinical suspicion of chlamydial infection (1) and 90 STD patients culture positive for ***C. trachomatis*** (2)) as well as 159 IgM negative sera (reference ELISA) from blood donors (3) (men and women aged 20 to 60 years) were investigated for the **determination of specificity.**

38 sera from patients with respiratory infections (4) were investigated for the **determination of sensitivity.**

IgM antibodies to ***C. pneumoniae*** were detectable by MIF in all sera.

Patient Group	Specificity IgM
Sera without IgM antibodies to C. pneumoniae by MIF: (1) Patients with suspicion of chlamydial infection (n=31) (2) STD patients (n=90)	90% (28/31) 98% (88/90)
C. pneumoniae IgM negative sera in reference ELISA: (3) Blood donors (n=159)	99% (157/159)
Patient Group	Sensitivity IgM
Sera with IgM antibodies to C. pneumoniae by MIF: (4) Patients with respiratory infections (n=38)	97% (37/38)

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation (n = 11)		
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean OD	SD	CV (%)
NC	0.036	0.003	9	21	NC	0.035	0.003	10
BC	0.503	0.027	5	21	BC	0.521	0.027	5
PC	1.216	0.047	4	21	PC	1.225	0.063	5
N° 1	0.844	0.063	7	21	N° 3	0.051	0.004	9
N° 2	0.719	0.042	6	21	N° 4	0.848	0.061	7

NC = negative control; BC = weak positive control (not included in the kit);
PC = positive control

GENERAL HANDLING ADVICES

- * To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- * The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- * After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.
- * After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- * The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- * Reagents of human origin have been tested and found to be negative for HBsAg, for antibodies to HIV-1/2 and to HCV. Nevertheless, it is strongly recommended that these materials as well as those of animal origin (see kit contents), should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

DISPOSAL CONSIDERATIONS

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

Date of issue: 20.08.2004

Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac

Trousse pour la détection par dosage immuno-enzymatique
des anticorps IgM anti-**Chlamydia pneumoniae**

Réf.: 432/TMB

DESTINEE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

INTRODUCTION

Les Chlamydiae sont des bactéries pathogènes gram-négatives. Elles possèdent obligatoirement un cycle vital intracellulaire dans les couches superficielles des muqueuses, dans les cellules endothéliales, dans les cellules du muscle lisse et, d'après des récentes découvertes, dans certaines structures tissulaires du système nerveux central. Les Chlamydiae dépendent des phosphates riches en énergie de leur cellules hôtes et sont par conséquent appelés des parasites énergétiques.

Le genre Chlamydia comprend quatre espèces: **C. pneumoniae**, **C. trachomatis**, **C. psittaci** et **C. pecorum**. **C. pneumoniae** et **C. trachomatis** sont des agents pathogènes stricts de l'homme. **C. psittaci** est pathogène pour l'homme et pour une grande variété d'espèces animales. Jusqu'à présent, **C. pecorum** a été isolé uniquement chez les animaux.

Les infections à **C. pneumoniae** surviennent dans le monde entier. L'éventail des maladies, en plus de maladies grippales, comprend sinusites, pharyngites, bronchites, maladies pulmonaires obstructives chroniques, pneumonie et arthrite réactive. Une implication de **C. pneumoniae** dans l'asthme infectieux, la sarcoïdose, le cancer pulmonaire, l'athérosclérose, l'infarctus aigu du myocarde, l'AVC, la sclérose multiple et l'apparition tardive de la maladie d'Alzheimer est actuellement en cours d'investigation.

D'après Grayston et Saikku (1989), qui ont été les premiers à décrire cette espèce de Chlamydia, presque tout le monde est infecté et réinfecté par **C. pneumoniae** tout le long de sa vie. L'évolution symptomatique principalement faible et/ou diffuse des infections à **C. pneumoniae** rend leur détection plus difficile; des infections indétectables peuvent conduire vers une évolution chronique de la maladie avec des séquelles graves.

La prévalence des infections à **C. pneumoniae** a été estimée au moins à 10% chez les enfants pas encore scolarisés, suivie par une forte augmentation jusqu'à 50% au-delà de 20 ans et jusqu'à 80 - 100% après 70 ans.

Le diagnostic des infections à **C. pneumoniae** réside dans l'isolement de l'agent pathogène dans les cultures cellulaires, la détection directe de l'antigène, les tests d'amplification de l'acide nucléique et la sérologie.

L'isolement de l'agent pathogène dans les cultures cellulaires nécessite en général plusieurs étapes successives; c'est une technique longue réservée à des laboratoires spécialisés et seulement réussie dans quelques cas. Les dosages par immunofluorescence indirecte (IF) et les dosages immuno-enzymatiques (EIA) n'ont pas été très largement utilisés; on a signalé qu'ils sont d'une faible sensibilité et spécificité. Jusqu'à présent il n'y a pas de PCR ou LCR commercialement disponible.

Les défauts des méthodes de culture et non culture, pour le diagnostic des infections à **C. pneumoniae** ont fait de la sérologie la méthode de choix.

Pour la détection des anticorps spécifiques d'espèces, la microimmunofluorescence (MIF) a été considérée comme «méthode de référence». La MIF est laborieuse, subjective, et nécessite beaucoup d'expérience. Ce système de dosage n'est pas standardisé; l'utilisation de différents antigènes et des différents critères pour établir la valeur seuil pour les infections passées et récentes ou actuelles, donne lieu à des variations significatives des résultats, entre les laboratoires.

La méthode **Chlamydia pneumoniae-sELISA medac** utilise un antigène spécifique et hautement purifié. La détection des anticorps IgM, IgA, et IgG permet l'évaluation du stade de l'infection et le suivi après traitement. Les anticorps IgM indiquent avec un degré élevé de certitude une infection aiguë.

La trousse **Chlamydia pneumoniae-sELISA medac** répond aux besoins de standardisation, objectivité, reproductibilité et automatisation dans le laboratoire, en routine.

En plus de:

Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac

Réf.: 432/TMB pour 96 déterminations

nous distribuons aussi les produits suivants:

Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac

Réf.: 430/TMB pour 96 déterminations,

Chlamydia pneumoniae-IgA-sELISA medac

Réf.: 431/TMB pour 96 déterminations,

Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac

Réf.: 497/TMB pour 96 déterminations,

Chlamydia trachomatis-IgA-pELISA medac

Réf.: 498/TMB pour 96 déterminations,

Chlamydia-IgG-rELISA medac

Réf.: 480/TMB pour 96 déterminations,

Chlamydia-IgA-rELISA medac

Réf.: 490/TMB pour 96 déterminations,

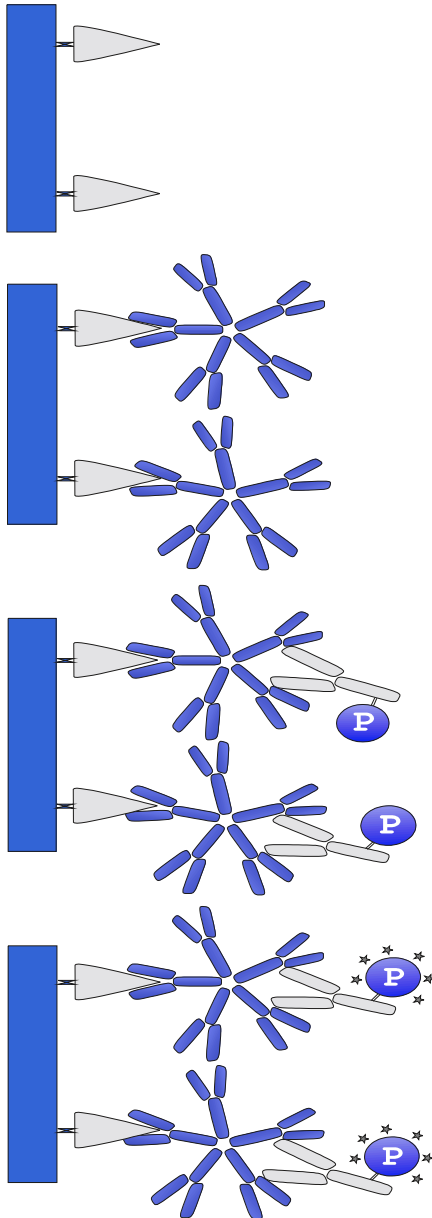
Chlamydia-IgM-rELISA medac

Réf.: 485/TMB pour 96 déterminations,

cHSP60-IgG-ELISA medac

Réf.: 435 pour 96 déterminations.

PRINCIPE DU DOSAGE



La microplaque est revêtue avec une préparation antigénique spécifique fortement purifiée de *C. pneumoniae*.

Les anticorps spécifiques anti-*C. pneumoniae* présents dans l'échantillon, vont se lier à l'antigène.

Les anticorps anti-IgM humaines conjugués à la peroxydase vont se lier aux anticorps IgM (P = peroxydase).

Incubation avec TMB-substrat (*). La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. L'absorption est lue sur un spectrophotomètre.

Avantages du DOSAGE

- ☞ Haute sensibilité et spécificité.
- ☞ Micropuits sécables permettant l'utilisation efficace du test.

CONTENU DE LA TROUSSE

Réf.: 432/TMB

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits en U, de couleur rose (avec support et déshydratant, dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, revêtus d'antigène spécifique de *C. pneumoniae* et avec du sérum foetal de veau, prêts à l'emploi.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Contrôle négatif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain; prêt à l'emploi, couleur bleue. Contient du sérum de veau nouveau-né, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Contrôle positif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain; prêt à l'emploi, couleur bleue. Contient de la SAB, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
4.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, contenant un tampon PBS/Tween (10 x), pH 7,2-7,4, contient du ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Diluant pour échantillons: 1 flacon de 110 ml contenant une solution tamponnée PBS/Tween/sérum de veau nouveau-né, pH 7,0 - 7,2, prête à l'emploi, couleur bleue, contient du ProClin™ 300.
6.

CON

Conjugué: 4 flacons de 5,0 ml chacun, contenant une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgM humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort (HRP). Prête à l'emploi, couleur rouge. Contient de la SAB, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
7.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml de solution prête à l'emploi.
8.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 14 ml chacun, contenant de l'acide sulfurique (H₂SO₄) 0,5 M, prête à l'emploi.
9.

RF-ABS

Absorbant IgG/FR: 1 flacon de 4 ml, contenant des anticorps de chèvre anti-IgG humaines, prêt à l'emploi. Contient moins de 0,1% d'azide de sodium.

1. CONSERVATION ET STABILITE

MATERIEL/REACTIFS	ETAT	CONSERVATION	STABILITE
Trousse	non ouvert	2 - 8 °C	jusqu'à date de péremption
Microplaque	ouvert	2 - 8 °C dans le sachet avec déshydratant	12 semaines
Contrôles	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Tampon de lavage	dilué	2 - 8 °C	12 semaines
Diluant pour échantillons	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Conjugué	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
TMB-substrat	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Solution d'arrêt	ouvert	2 - 8 °C	jusqu'à date de péremption
Solution absorbante IgG/FR	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines

Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.

2. REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- 2.1. Eau pour injection ou bidistillée. L'utilisation d'eau désionisée n'est pas conseillée.
- 2.2. Micropipettes réglables.
- 2.3. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des sérums de patients.
- 2.4. Dispositif de lavage des microplaques (par exemple multistepper ou ELISA washer).
- 2.5. Incubateur à 37 °C.
- 2.6. Lecteur de plaque avec filtres à 450 nm et 620 - 650 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante.

Calculer le nombre de puits nécessaire.

3.1. Microplaque

Le sachet d'aluminium avec le déshydratant doit être soigneusement rescellé, après avoir retiré les puits. La conservation et la durée de vie des puits sont indiqués au point 1.

3.2. Tampon de lavage

Mélanger un volume de tampon de lavage (10 x) avec neuf volumes d'eau pour injection [ex. 50 ml de tampon de lavage (10 x) avec 450 ml d'eau]. 10 ml de tampon dilué sont nécessaires pour 8 puits.

Des cristaux peuvent se former dans la solution concentrée de lavage (10 x). Dissoudre ces cristaux en chauffant (max. 37 °C) ou en tournant, à température ambiante.

Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôles, conjugué) de différents lots. Par contre, le diluant pour échantillons, le tampon de lavage, le substrat-TMB, l'absorbant IgG/RF et la solution d'arrêt sont interchangeables dans tous les Chlamydiae- et Mycoplasmes-ELISA medac.

Des réactifs d'autres fabricants ne peuvent pas être utilisés.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi.

4. ECHANTILLONS

4.1. Le test est à utiliser avec des échantillons sériques, mais pas avec des échantillons de plasma.

4.2. Une absorption des IgG/FR doit être réalisée afin d'éviter des interférences avec des concentrations élevées d'IgG et de facteur rhumatoïde (FR).

4.3. Le traitement préalable du sérum, ex. inactivation, n'est pas nécessaire. Toutefois, il ne doit pas être contaminé par des microorganismes ni contenir des érythrocytes.

5. PROCEDURE DE DOSAGE

5.A. ABSORPTION DES IgG/FR

Attention :

- * **Les contrôles sont prêts à l'emploi (il n'est pas nécessaire d'effectuer une absorption).**
- * **Les volumes suivants indiqués s'appliquent uniquement à des déterminations simples.**

5.A.1. Sérum: diluer 10 µl de sérum avec 240 µl de diluant pour échantillons (dilution 1/25).

5.A.2. Absorption: mélanger 30 µl de solution absorbante IgG/FR et 30 µl de sérum dilué (dilution 1/50) et incubé pendant 15 min à température ambiante.

Alternative: L'absorption peut être réalisée pendant toute la nuit à 2 - 8 °C.

5.A.3. La dilution finale est de 1/50.

5.B. REALISATION DU DOSAGE

5.B.1. Couper le sachet d'aluminium au-dessus du zip et extraire le nombre des puits nécessaire (voir 3.1.).

Les puits sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être pré-lavés.

5.B.2. Distribuer 50 µl de diluant pour échantillons dans le puits blanc A1 (voir 6.A.) et 50 µl de contrôle négatif (en doublets), de contrôle positif et d'échantillon de patient dilué dans les puits respectifs.

Remarque: La plaque peut, à ce stade de la technique, être conservée dans une chambre humide 30 min à TA.

5.B.3. Incuber la microplaque pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte avec un couvercle d'incubation.

5.B.4. Après incubation, laver les puits trois fois avec 200 µl de tampon de lavage dilué par puits. Vérifier que tous les puits sont bien remplis. Après lavage, tapoter délicatement les puits sur du papier absorbant.

Ne pas laisser sécher les puits! Poursuivre immédiatement la procédure!

5.B.5. Ajouter le conjugué (rouge) dans chaque puits.

Distribuer 50 µl de conjugué dans les puits si la procédure est réalisée manuellement.

Attention:

Si la procédure est réalisée sur automate, il faut distribuer 60 µl de conjugué dans chaque puits, en raison de l'évaporation élevée des chambres d'incubation des automates.

L'utilisation du test sur les appareils automatiques a été validée pendant l'évaluation du test. Néanmoins nous recommandons de vérifier la compatibilité du test avec les appareils utilisés dans le laboratoire.

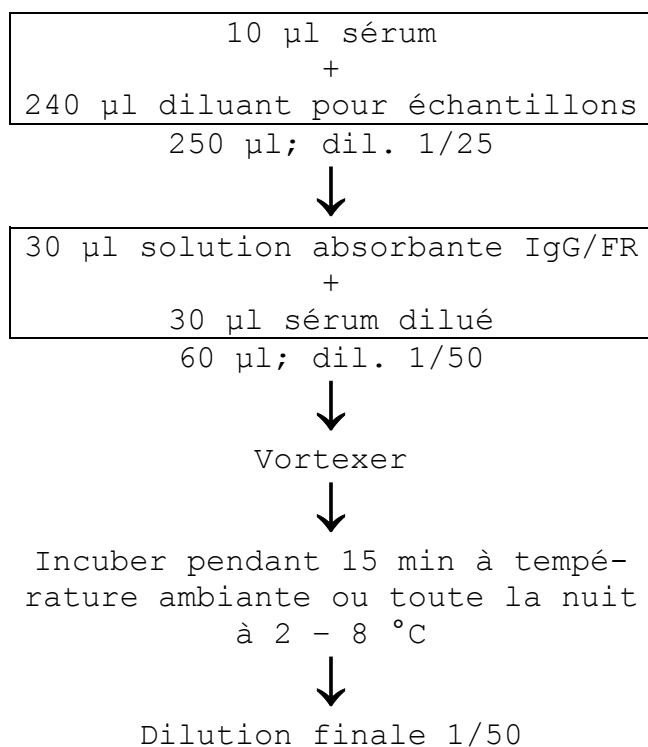
- 5.B.6. Incuber de nouveau la microplaque, pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte avec un couvercle d'incubation.
- 5.B.7. Après incubation, laver les puits à nouveau (voir 5.B.4.).
- 5.B.8. Ajouter 50 μ l de TMB-substrat dans chaque puits et incuber la microplaque, pendant 30 min (\pm 2 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte avec un couvercle d'incubation, dans l'obscurité. Les échantillons positifs deviennent bleus.
- 5.B.9. Arrêter la réaction en ajoutant 100 μ l de solution d'arrêt dans chaque puits. Les échantillons positifs deviennent jaunes.

Bien nettoyer le dessous des puits avant la lecture photométrique et vérifier l'absence de bulles d'air dans les puits.

La lecture doit être effectuée dans les 15 min après l'ajout de la solution d'arrêt!

5.C. TABLEAU POUR L'ABSORPTION D'IgG/FR

Indication par détermination



5.D. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon
Diluant pour échantil- lons	50 µl	-	-	-
Contrôle négatif	-	50 µl	-	-
Contrôle positif	-	-	50 µl	-
Echantillon	-	-	-	50 µl
Incuber pendant 60 min à 37 °C, laver 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage dilué				
Conjugué	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incuber pendant 60 min à 37 °C, laver 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage dilué				
TMB-substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incuber pendant 30 min à 37 °C dans l'obscurité				
Solution d'arrêt	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Lecture photométrique à 450 nm (réf. 620 - 650 nm)				

*) procédure manuelle/automatique (voir 5.B.5.)

6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

- * Lire les valeurs d'absorbance (D.O.) à 450 nm (longueur d'onde de référence 620 - 650 nm).
- * Soustraire la valeur D.O. du puits blanc (puits A1) de toutes les autres valeurs de D.O.
- * La valeur D.O. du puits blanc doit être inférieure à **0,100**.
- * La valeur moyenne D.O. du **contrôle négatif** doit être inférieure à **0,100**.
- * La valeur D.O. du **contrôle positif** doit être supérieure à **0,800**.
- * **Valeur seuil (cut-off) = valeur moyenne D.O. du contrôle négatif + 0,380**
- * **Zone grise = valeur seuil ± 10%**

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS

6.B.1. QUALITATIVE

Résultat	Interprétation
D.O. < zone grise	négatif
D.O. = Valeur seuil ± 10%	douteux
D.O. > zone grise	positif

6.B.2. QUANTITATIVE

Index seuil : $\frac{\text{D.O.échantillon}}{\text{D.O. seuil}}$	Interprétation
< 0,9	négatif
0,9 - 1,1	douteux
> 1,1	positif

- * Des échantillons qui ont des valeurs de D.O. dans la zone grise doivent être dosés de nouveau avec des échantillons frais prélevés 14 jours après, afin de pouvoir déterminer un changement dans le titre d'anticorps.
- * Les résultats devraient être toujours interprétés conjointement avec IgG et IgA et les données cliniques et autres paramètres diagnostiques.
- * Des concentrations élevées d'hémoglobine et de bilirubine dans le sérum, n'ont pas d'influence sur les résultats.
- * Cependant, des concentrations élevées de lipides peuvent augmenter les valeurs de D.O. des échantillons négatifs.
- * Des réactions croisées avec des anticorps anti-nucléaires, avec des anticorps hétérophiles, ainsi qu'avec des anticorps anti-**C. psittaci** et anti-**C. trachomatis** ne peuvent pas être exclues dans certains cas individuels.

6.C. INTERPRÉTATION SPECIFIQUE IgM

Résultats Possibles	Interprétation
+	1. Indication d'infection aiguë.
+/-	2. Des IgM en zone grise. Possibilité d'un stade très précoce d'infection aiguë. Doser de nouveau les IgM après 10 - 14 jours et doser les IgG et IgA.
-	3. Négatif vis à vis des IgM anti- C. pneumoniae . Dans le cas de suspicion clinique justifiée, doser les IgA et IgG.

Commentaire :

Dans le cas d'infections à Chlamydia aiguës récentes, le résultat des anticorps sérologiques peut être négatif, malgré le tableau clinique et une détection positive d'antigènes. Si l'on souhaite une confirmation sérologique du résultat d'antigène positif ou un suivi, il est conseillé de refaire le test après 14 jours pour déterminer l'existence de séroconversion.

7. PERFORMANCE DU DOSAGE

Les performances du dosage ont été déterminées pendant l'évaluation de la trousse.

7.A. SPECIFICITE ET SENSIBILITE

121 sérums négatifs, par MIF, vis-à-vis des IgM anti-*C. pneumoniae* (31 patients avec suspicion clinique d'infection à Chlamydia (1) et 90 patients MST avec culture positive de *C. trachomatis* (2)), ainsi que 159 sérums IgM négatifs (ELISA référence) provenant de donneurs de sang (3) (hommes et femmes âgés de 20 à 60 ans) ont été examinés pour déterminer **la spécificité**.

38 sérums provenant de patients atteints d'infections respiratoires (4) ont été examinés pour déterminer **la sensibilité**.

Les anticorps IgM anti-*C. pneumoniae* étaient détectables par MIF dans tous les sérums.

Groupe de patients	Spécificité IgM
Sérums sans anticorps IgM anti- <i>C. pneumoniae</i> par MIF: (1) Patients avec suspicion d'infection à Chlamydia (n=31) (2) Patients MST (n=90)	90% (28/31) 98% (88/90)
Sérums négatifs vis à vis des IgM <i>C. pneumoniae</i> (ELISA référence): (3) Donneurs de sang (n=159)	99% (157/159)
Groupe de patients	Sensibilité IgM
Sérums avec anticorps IgM anti- <i>C. pneumoniae</i> par MIF: (4) Patients avec infections respiratoires (n=38)	97% (37/38)

7.B. PRECISION

Echant.	Variation Intra-essai				Echan.	Variation Inter-essais (n = 11)		
	moy DO	DS	CV (%)	n		moy DO	DS	CV (%)
NC	0,036	0,003	9	21	NC	0,035	0,003	10
BC	0,503	0,027	5	21	BC	0,521	0,027	5
PC	1,216	0,047	4	21	PC	1,225	0,063	5
N° 1	0,844	0,063	7	21	N° 3	0,051	0,004	9
N° 2	0,719	0,042	6	21	N° 4	0,848	0,061	7

NC = contrôle négatif; BC = contrôle positif bas (non inclus dans la trousse); PC = contrôle positif

INDICATIONS GENERALES

- * Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter les contaminations croisées.
- * Les flacons des réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- * Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur durée de vie.
- * Après leur utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter le mélange des réactifs concernant d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- * Il faut appliquer la réglementation en vigueur en matière de sécurité et de santé.
- * Les réactifs d'origine humaine ont été dosés et trouvés négatifs en AgHBs, en anticorps anti-HIV-1/2 et anti-VHC. Néanmoins, il est fortement conseillé de manipuler ces produits, ainsi que ceux d'origine animale (voir contenu de la trousse), comme étant potentiellement infectieux et de les utiliser avec les précautions nécessaires.

CONSEIL D'ELIMINATION

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser des déchets dangereux.

Date de mise à jour: 20.08.2004

LITERATUR/REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE

- Balin, B.J., Gérard, H.C., Arking, E.J., Appelt, D.M., Branigan, P.J., Abrams, J.T., Whittum-Hudson, J.A., Hudson, A.P.: Identification and localization of ***Chlamydia pneumoniae*** in the Alzheimer's brain. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 23-42 (1998).
- Christiansen, G., Boesen, T., Hjerno, K., Daugaard, L., Mygind, P., Madsen, A.S., Knudsen, K., Falk, E., Birkelund, S.: Molecular biology of ***Chlamydia pneumoniae*** surface proteins and their role in immunopathogenicity. *Am. Heart J.* 138, S491-495 (1999).
- Danesh, J., Collins., Peto, R.: Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 350, 430-436 (1997).
- Elkind, M.S., Lin, I.F., Grayston, J.T., Sacco, R.L.: ***Chlamydia pneumoniae*** and the risk of first ischemic stroke. The Northern Manhattan stroke study. *Stroke* 31, 1521-1525 (2000).
- Gérard, H.C., Schumacher, R.H., El-Gabalawy, H., Goldbach-Mankys, R., Hudson, A.P.: ***Chlamydia pneumoniae*** present in the human synovium are viable and metabolically active. *Microbiol. Pathol.* 29, 17-24 (2000).
- Grayston, J.T.: Epidemiology of ***Chlamydia pneumoniae*** (TWAR). In: *Chlamydia Research*. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11.-14. September, 211-214 (1996).
- Grayston, J.T., Aldous, M.B., Easton, A., Wang, S.P., Kuo C.C., Campbell, L.A., Altman, J.: Evidence that ***Chlamydia pneumoniae*** causes pneumonia and bronchitis. *J. Infect. Dis.* 168, 1231-1235 (1993).
- Gupta, S., Leatham, E.W., Carrington, D., Mendall, M.A., Kaski, J.C., Camm, A.J.: Elevated ***Chlamydia pneumoniae*** antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 69, 401-407 (1997).
- Gurfinkel, E., Bozovich, G., Caroca, A., Beck, E., Mautner, B.: Randomised trial of roxithromycin in nin-Q-wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. *Lancet* 350, 404-407 (1997).
- Hahn, D.L., Peeling, R.W., Dillon, E., McDonald, R., Saikku, P.: Serologic Markers for ***C. pneumoniae*** in asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 84, 227-233 (2000).
- Heinzl, S.: Chlamydien, Arteriosklerose, Asthma und MS. *Med. Monatsschr. Pharm.* 23, 37 (2000).
- Hunter, S.F., Hafler, D.A.: Ubiquitous pathogens: links between infection and autoimmunity in MS? *Neurology* 55, 164-165 (2000).
- Kuo, C.-C., Jackson, L.A., Campbell, L.A., Grayston, J.T.: ***Chlamydia pneumoniae*** (TWAR). *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 451-461 (1995).

Layh-Schmitt, G., Bendl, C., Hildt, U., Dong-Si, T., Juttler, E., Schnitzler, P., Grond-Ginsbach, C., Grau, A.J.: Evidence for infection with ***Chlamydia pneumoniae*** in a subgroup of patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 47, 652-655 (2000).

Maass, M., Bartels, C., Engel, P.M., Mamat, U., Sievers, H.H.: Endovascular presence of viable ***Chlamydia pneumoniae*** is a common phenomenon in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 827-832 (1998).

Morré, S.A., De Groot, C.J., Killestein, J., Meijer, C.J., Polman, C.H., Van der Valk, P., Van den Brule, A.J.: Is ***Chlamydia pneumoniae*** present in the central nervous system of multiple sclerosis patients? *Ann. Neurol.* 48, 399 (2000).

Muhlestein, J.B.: The link between ***Chlamydia pneumoniae*** and atherosclerosis. *Infect. Med.* 14, 380-382, 392, 426 (1997).

Saikku, P.: Chronic ***Chlamydia pneumoniae*** infections. In: *Chlamydia Research*. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11.-14. September. 215-218 (1996).

Saikku, P., Leinonen, M., Mattila, K., Ekman, M.R., Nieminen, M.S., Mäkela, P.H., Huttunen, J.K., Valtonen, V.: Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2, 983-986 (1988).

Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmäki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H., Huttunen, J.K.: Chronic ***Chlamydia pneumoniae*** infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann. Int. Med.* 116, 272-278 (1992).

Samra, Z., Soffer, Y.: IgA antichlamydial antibodies as a diagnostic tool for monitoring of active chlamydial infection. *Eur. J. Epidemiol.* 8, 882-884 (1992).

Schumacher, H.R.: Chlamydial Arthritis. In: *Chlamydia Research*. Pekka Saikku (ed.). Proceedings of the 4th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Helsinki, Finland, 20.-23. August. 229 (2000).

Sriram, S., Stratton, C.W., Yao, S.: ***Chlamydia pneumoniae*** infection in the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 46, 6-14 (1999).

Stille, W., Just-Nübling, G.: Argumente für eine Antibiotika-Therapie der Arteriosklerose. *Chemotherapie Journal* 6, 1-5 (1997).