

Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA 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 - 347

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. 14

Français: p. 26

Literatur/References/Littérature: S./p./p. 38

Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgG-Antikörpern
gegen *Chlamydia trachomatis*

Katalog-Nr.: 497-TMB

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

Chlamydien gehören zu den gramnegativen Bakterien. Sie leben intrazellulär in den Epithelien von Schleimhäuten und nach neueren Erkenntnissen auch in den Endothelien und glatten Muskelzellen der Gefäße. Chlamydien sind auf energiereiche Phosphate der Wirtszelle angewiesen und werden daher als Energieparasiten bezeichnet.

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

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

C. trachomatis gehört zu den weltweit am häufigsten sexuell übertragenen Erregern von Infektionen des Urogenitaltrakts und des Auges. Unter der Geburt kann *C. trachomatis* vom infizierten Geburtskanal auf das Neugeborene übertragen werden. Als Folge davon können sich Neugeborenenkonjunktivitis und/oder -pneumonie entwickeln.

C. trachomatis tritt in 18 verschiedenen Serotypen auf, die unterschiedlichste Krankheitsbilder hervorrufen. Die Serotypen A-C sind verantwortlich für das endemische Trachom, das zur Erblindung führen kann. Mehrere 100 Millionen Menschen in den Ländern der Dritten Welt leiden unter dieser Augenkrankheit. Die Serotypen L₁-L₃ verursachen das Lymphogranuloma venereum (Tropische Geschlechtskrankheit). In den Industrieländern rufen die Serotypen D-K die am häufigsten sexuell übertragenen okulogenitalen Infektionen hervor.

Charakteristisch für eine *C. trachomatis*-Infektion bei der Frau ist ihr überwiegend asymptomatischer Verlauf. Hieraus resultieren die vielen chronischen Erkrankungen, die durch die aszendierten und persistierenden Erreger unterhalten werden. Durch eine periphere Infektion entwickelt sich meist eine Zervizitis. Eine Urethritis tritt dagegen wesentlich seltener auf. Zwischen der Erstinfektion und den chronischen Folgeerkrankungen vergehen häufig Monate oder Jahre.

Zu den *C. trachomatis*-Infektionen mit überwiegend chronischem Verlauf gehören bei der Frau: Endometritis, Adnexitis, Periappendizitis, Perihepatitis, Peritonitis, Reaktive Arthritis. Die letztgenannte Arthritis-Form tritt auch beim Mann als sogenannte posturethritische reaktive Arthritis auf.

Als Folge wiederholter Adnexitiden verkleben die Tuben, was häufig zu sekundärer Sterilität führt. Beim Mann ascendieren die Erreger nach nicht ausgeheilter Urethritis in den Nebenhoden (→ Epididymitis) und z. T. auch in die Prostata (→ Prostatitis). In diesem Zusammenhang wird ebenfalls eine Einschränkung der Fertilität diskutiert.

Die Erreger einer peripheren *C. trachomatis*-Infektion können mit Direktnachweisen (ELISA, IFT) oder durch molekularbiologische Verfahren wie PCR und LCR mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. *C. trachomatis*-Infektionen, die nicht erkannt oder austherapiert werden, führen jedoch häufig zu einem chronischen Krankheitsverlauf. In diesen Fällen ist der direkte Erregernachweis nur bedingt möglich und muß durch die Serologie ergänzt werden.

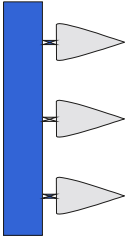
Chlamydien besitzen immundominante gattungsspezifische Antigenstrukturen. Hier ist besonders das Lipopolysaccharid (LPS) zu nennen, gegen das sich die erste Immunantwort richtet. Um jedoch eine artspezifische Chlamydienserologie durchführen zu können, bedarf es artspezifischer Antigene. Die immundominanten, artspezifischen Epitope für *C. trachomatis* liegen auf den variablen Domänen des Hauptmembranproteins (Major outer membrane protein = MOMP).

Als sogenannter „Goldstandard“ in der artspezifischen Serologie gilt bislang die Mikroimmunfluoreszenz (MIF). Dabei werden gereinigte Elementarkörperchen (Vollantigen) verwendet. Eine Kreuzreaktion zwischen den einzelnen Chlamydien-Arten ist daher nicht auszuschließen.

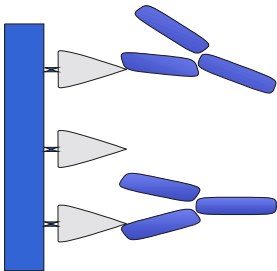
Der *C. trachomatis*-pELISA medac verwendet ein synthetisches Peptid-Antigen aus der immundominanten Region des MOMP. Mit diesem hochspezifischen Antigen ist eine Abgrenzung von Antikörpern gegen *C. trachomatis* aus dem Gesamtpool antichlamydialer Antikörper mit hoher Spezifität gegeben.

Bei chronischen Krankheitsverläufen ist die Serologie die Methode der Wahl. Hier spielt der Nachweis von IgA- in Kombination mit IgG-Antikörpern die entscheidende Rolle. Die Serologie ist ebenfalls als begleitende Diagnostik bei Verdacht auf eine periphere Infektion und für das Follow-up nach Therapie indiziert.

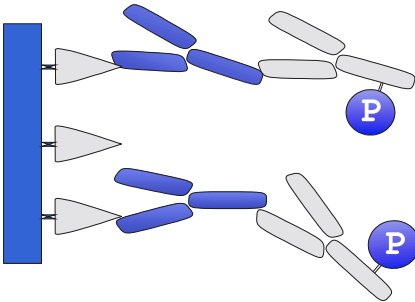
TESTPRINZIP



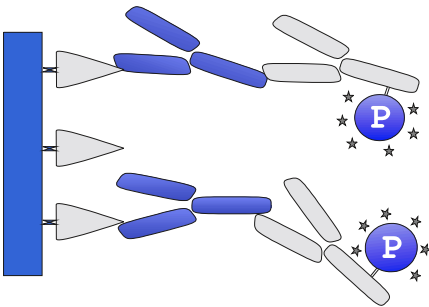
Mit *C. trachomatis*-spezifischem, synthetischem Peptid beschichtete Mikrotiterplatte.



Die *C. trachomatis*-spezifischen Antikörper aus dem Patientenserum werden an das Antigen gebunden.



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



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

Testvorteile

- ☞ Keine falsch positiven Ergebnisse durch Kreuzreaktionen mit anderen Chlamydienarten.
- ☞ Keine Infektiösität des Antigenmaterials.
- ☞ Chemisch definierte Struktur des Antigens.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.

PACKUNGSINHALT

KAT.-NR.: 497-TMB

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, lila markiert (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit **C. trachomatis**-spezifischem, synthetischem Peptid und NBCS, gebrauchsfertig.
2.

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

Negative Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält NBCS, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

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

Positive Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 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 4,5 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, grün gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
7.

TMB

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

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 11 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.

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

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 - 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 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.

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

4.3. Die Seren werden 1:50 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Zur Titerbestimmung können die Proben beliebig weiterverdünnt werden.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

5.1. 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.

5.2. 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.

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.4. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

- 5.5. Konjugat (grün gefärbt) in alle Vertiefungen pipettieren.

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

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 μ l 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.

- 5.6. Erneut 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.4.).
- 5.8. 50 μ l TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren und 30 min (± 2 min) bei 37 °C (± 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.9. Durch Zugabe von 100 μ l 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.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Probe
Probenverdünnungspuffer	50 µl	-	-	-
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
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. 5.5.)

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 + 0,340**
- * **Grenzbereich = Cut-off ± 10%**

Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!

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 IgA und im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.
- * Hohe Hämoglobin-, Bilirubin- und Lipidkonzentrationen im Serum beeinflussen die Testergebnisse nicht.

6.C. SPEZIFISCHE IgG-/IgA-INTERPRETATION FÜR DAS SERUM

Mögliche Ergebnisse		Interpretation
IgG	IgA	
+	+	1. IgG und IgA positiv; Hinweis auf eine Infektion. Weitere Beurteilung abhängig von Symptomatik und Titerverlauf.
+	-	2. Nur IgG positiv; Anzeichen einer zurückliegenden Infektion. Bei klinischem Verdacht 4-fachen IgG-Titeranstieg zwischen 2 Serumproben ermitteln und erneut auf IgA prüfen.
+	+/-	3. IgG positiv, IgA im Graubereich; Möglichkeit einer beginnenden oder abklingenden Infektion; Überprüfung des IgA nach 10 - 14 Tagen.
+/-	-	4. Nur IgG im Graubereich; zurückliegende Infektion nicht auszuschließen. Bei klinischem Verdacht IgG und IgA nach 10 - 14 Tagen überprüfen.
-	+	5. Nur IgA positiv; Möglichkeit eines frühen Infektionsstadiums oder solitäres, persistierendes IgA. Überprüfung des IgA und IgG nach 10 - 14 Tagen.
-	+/-	6. Nur IgA im Graubereich; Möglichkeit eines frühen Infektionsstadiums; Überprüfung des IgA und IgG nach 10 - 14 Tagen.
+/-	+	7. IgG im Graubereich, IgA positiv; Möglichkeit eines frühen Infektionsstadiums; Überprüfung des IgA und IgG nach 10 - 14 Tagen.
-	-	8. IgG und IgA negativ; kein serologischer Hinweis auf eine Infektion. Bei begründetem klinischen Verdacht sollte der direkte Erregernachweis geführt, sowie IgA und IgG nach 10 - 14 Tagen überprüft werden.

Hinweis:

Bei frischen, akuten Chlamydieninfektionen 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 10 - 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 Seren von Kindern im Alter von < 10 Jahren und Patienten mit serologisch gesicherter (MIF) *C. pneumoniae*-Infektion gemessen.

Zur **Ermittlung von Sensitivitäten/Prävalenzen** wurden Seren von drei verschiedenen Probandengruppen gemessen.

Probandengruppe		Spezifität	
		IgA	IgG
Kinder < 10 Jahre		98% (n=100)	99% (n=100)
Patienten mit <i>C.pneumoniae</i> - Infektion (MIF-positiv)		100% (n=47)	100% (n=47)
		Sensitivität/Prävalenz	
STD-Patienten kulturnegativ für <i>C.tracho-</i> <i>matis</i>	<i>C.trachomatis</i> - pELISA	6,2% (n=112)	25,0% (n=96)
	MIF	3,6% (n=112)	27,1% (n=96)
STD-Patienten kulturpositiv für <i>C.tracho-</i> <i>matis</i>	<i>C.trachomatis</i> -pELISA	24,6% (n=114)	65,1% (n=106)
	MIF	20,2% (n=114)	67,0% n=106)
Blutspender	<i>C.trachomatis</i> -pELISA	6,4% (n=299)	15,1% (n=299)
Rheumapatienten ¹	<i>C.trachomatis</i> -pELISA	41,0% (n=83)	48,2% (n=83)

¹Die Seren wurden nach einem positiven IgG-Befund im genusspezifischen Chlamydien-rELISA vorselektiert.

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 13)		
	Ø OD	S	VK (%)	n		Ø OD	S	VK (%)
NK	0,037	0,005	13,2	21	NK	0,038	0,011	30,4
GW	0,653	0,034	5,2	21	GW	0,371	0,045	12,0
PK	1,789	0,061	3,4	21	PK	1,502	0,094	6,2
Nr. 1	0,050	0,009	17,2	21	Nr. 3	1,724	0,102	5,9
Nr. 2	2,111	0,064	3,0	24	Nr. 4	0,525	0,070	13,4

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 oder anderen Chargen zu vermeiden, sollten alle Komponenten 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: 21.09.2007

Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac

Enzyme immunoassay for the detection of IgG antibodies
to *Chlamydia trachomatis*

Cat. no.: 497-TMB

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTRODUCTION

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

The genus Chlamydia comprises four species: *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. pecorum* and *C. trachomatis*.

C. pneumoniae and *C. trachomatis* are obligate pathogens of humans. *C. psittaci* is pathogenic for humans and a variety of animal species. Up to now *C. pecorum* has been isolated from animals only.

C. trachomatis is one of the most frequent agents causing sexually transmitted infections of the urogenital tract and the eye. During delivery *C. trachomatis* can be transferred to the infant and can cause neonatal conjunctivitis and pneumonia.

C. trachomatis is subdivided into 18 serovars causing different clinical manifestations. Serovars A-C are responsible for the endemic trachoma, an ocular disease, which can lead to blindness. It affects hundreds of million people in developing countries. Lymphogranuloma venereum, a tropical sexually transmitted disease, is the result of infections with serotypes L₁-L₃. In industrial countries serotypes D-K are the cause of the most frequent sexually transmitted oculo-genital infections.

Most *C. trachomatis* infections in women are asymptomatic. This results in the many chronic diseases sustained by the ascended, persisting agents. Initial site of infections is usually the cervix with the clinical manifestation of cervicitis. Urethritis is less common in women. Between a primary infection and the appearance of chronic sequelae often months or even years will pass. Asymptomatic *C. trachomatis* infections in women may lead to endometritis, adnexitis,

periappendicitis, perihepatitis, peritonitis and reactive arthritis. This arthritis form is also known in men as post-urethritic reactive arthritis.

Repeated adnexitis may lead to secondary infertility. In men ascending infections following asymptomatic urethritis may result in epididymitis and prostatitis. Reduction of male fertility due to *C. trachomatis* infections is also discussed.

Peripheral *C. trachomatis* pathogens can be detected with high sensitivity and specificity by laboratory methods like ELISA, IFT, PCR, LCR. However, unrecognized or insufficiently treated *C. trachomatis* infections often lead to chronic manifestations. In these cases the antigen determination is limited and have to be completed by serology.

Chlamydiae contain common immunodominant antigens like the genus-specific lipopolysaccharide (LPS). To perform species specific serology *C. trachomatis*-specific immunogenic structures are needed. These structures are located in the variable domains of the major outer membrane protein (MOMP).

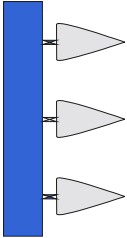
Until now the microimmunofluorescence test (MIF) is considered to be the so-called "gold standard" of species-specific serology. The MIF antigens consist of purified fixed total elementary bodies. Therefore a crossreactivity between the species cannot be excluded.

The *C. trachomatis*-pELISA medac uses a synthetic peptide from the immuno-dominant region of the MOMP. With this highly specific antigen a discrimination of *C. trachomatis*-specific antibodies from the whole anti-chlamydiae antibody response is possible with high specificity.

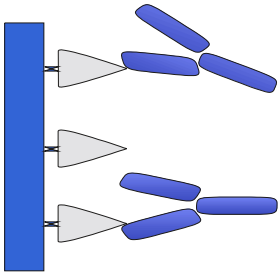
In infections with mainly chronic course serology is the method of choice.

Here, the detection of IgA antibodies in combination with IgG antibodies plays the decisive role. Serology also is indicated as additional method for the diagnosis of suspected peripheral *C. trachomatis* infections and for post-treatment follow up.

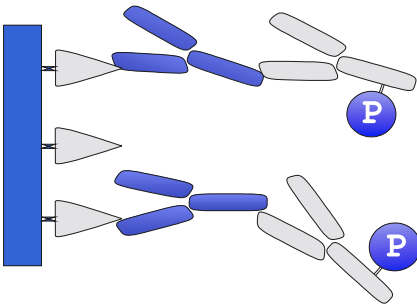
TEST PRINCIPLE



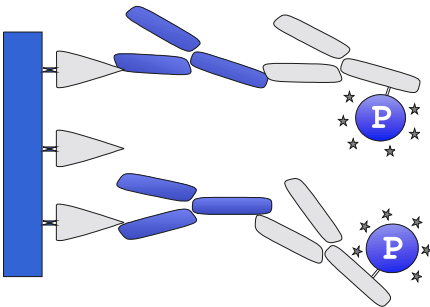
The plate is coated with synthetic *C. trachomatis*-specific peptid.



The *C. trachomatis*-specific antibodies from the specimen are bound to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies bind to the IgG 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

- ☞ No false positive results caused by crossreactivities with other Chlamydiae.
- ☞ Non infectious antigen material.
- ☞ Chemically defined structure of the antigen.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 497-TMB

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells, purple-coded (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with *C. trachomatis*-specific, synthetic peptid and NBCS, ready to use.
2.

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

Negative control: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains NBCS, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
3.

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

Positive control: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine 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 4.5 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready to use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
7.

TMB

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

STOP

Stop solution: 2 vials with 11 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.

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

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.

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. 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 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.

4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.

4.3. Sera have to be diluted 1:50 with sample diluent. They can be diluted further for titer determination.

5.A. TEST PROCEDURE

5.1. 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.

5.2. 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.

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

5.4. 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!

5.5. Add conjugate (coloured green) 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 recommend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.

5.6. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.4.).

5.8. Add 50 µl 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.

5.9. Stop the reaction by adding 100 µl 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.B. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Sample
Sample diluent	50 µl	-	-	-
Negative control	-	50 µl	-	-
Positive control	-	-	50 µl	-
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 5.5.)

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 + 0.340**
- * **Grey zone = Cut-off ± 10%**

Repeat the run if the results do not meet the specification!

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 IgA and with the clinical data and additional diagnostic parameters.
- * High concentrations of hemoglobin, of bilirubin and of lipid in serum do not have an influence on the results.

6.C. SPECIFIC IgG/IgA INTERPRETATION FOR SERUM

Possible Results		Interpretation
IgG	IgA	
+	+	1. IgG and IgA positive; indication of infection. Further judgement dependent on symptoms and titer course.
+	-	2. Only IgG positive; indication of a past infection. In case of clinical suspicion determine a fourfold IgG titer increase between two serum samples and retest for IgA.
+	+/-	3. IgG positive, IgA grey zone; possibility of a beginning or a subsiding infection; retest IgA after 10 - 14 days.
+/-	-	4. Only IgG in grey zone; past infection cannot be excluded. In case of clinical suspicion retest IgG and IgA after 10 - 14 days.
-	+	5. Only IgA positive; possibility of an early stage of infection or solitary, persisting IgA; retest IgA and IgG after 10 - 14 days.
-	+/-	6. Only IgA in the grey zone; possibility of a early stage of infection; retest IgA and IgG after 10 - 14 days.
+/-	+	7. IgG in the grey zone, IgA positive; possibility of an early stage of infection; retest IgA and IgG after 10 - 14 days.
-	-	8. IgG and IgA negative; no indication of infection. In case of justified clinical suspicion perform direct antigen detection and retest IgA and IgG after 10 - 14 days.

Comment:

In cases of fresh acute chlamydial infections the serological antibody results may be negative despite clinics 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 10 - 14 days for seroconversion.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

7.A. SPECIFICITY AND SENSITIVITY

Sera from children aged < 10 years and patients with serologically proven (MIF) *C. pneumoniae* infection were measured to determine the specificity.

Sera from three different patient groups were tested for the determination of sensitivity/prevalence.

Patient group	Specificity	
	IgA	IgG
Children < 10 years	98% (n=100)	99% (n=100)
Patients with <i>C. pneumoniae</i> infection (MIF positive)	100% (n=47)	100% (n=47)
	Sensitivity/Prevalence	
STD patients culture negative for <i>C. trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i> -pELISA	6.2% (n=112) 25.0% (n=96)
	MIF	3.6% (n=112) 27.1% (n=96)
STD patients culture positive for <i>C. trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i> -pELISA	24.6% (n=114) 65.1% (n=106)
	MIF	20.2% (n=114) 67.0% (n=106)
Blood donors	<i>C. trachomatis</i> -pELISA	6.4% (n=299) 15.1% (n=299)
Arthritis patients ¹	<i>C. trachomatis</i> -pELISA	41.0% (n=83) 48.2% (n=83)

¹The sera were preselected according to a positive IgG result in the genus-specific Chlamydia rELISA.

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation (n = 13)		
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean OD	SD	CV (%)
NC	0.037	0.005	13.2	21	NC	0.038	0.011	30.4
BC	0.653	0.034	5.2	21	BC	0.371	0.045	12.0
PC	1.789	0.061	3.4	21	PC	1.502	0.094	6.2
N° 1	0.050	0.009	17.2	21	N° 3	1.724	0.102	5.9
N° 2	2.111	0.064	3.0	24	N° 4	0.525	0.070	13.4

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: 21.09.2007

Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac

Trousse pour la détection par dosage immuno-enzymatique des anticorps IgG anti-*Chlamydia trachomatis*

Réf.: 497-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 et, d'après des récentes découvertes, dans les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse. 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. psittaci*, *C. pecorum* et *C. trachomatis*.

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.

C. trachomatis est l'un des agents qui provoque le plus fréquemment des maladies sexuellement transmissibles du tractus urogénital et des yeux. Pendant l'accouchement, *C. trachomatis* peut être transféré à l'enfant et peut provoquer conjonctivite néonatale et pneumonie.

Chez *C. trachomatis*, on a mis en évidence 19 sérotypes provoquant différentes manifestations cliniques. Les sérotypes A à C sont responsables du trachome endémique, maladie oculaire qui peut conduire à la cécité. Il affecte des centaines de millions des personnes dans les pays en voie de développement. La lymphogranulomatose vénérienne, maladie tropicale sexuellement transmissible, est le résultat d'infections avec les sérotypes L1 à L3. Dans les pays industrialisés, les sérotypes D à K sont la cause la plus fréquente d'infections oculaires et génitales sexuellement transmissibles.

La plupart des infections à *C. trachomatis* chez la femme sont asymptomatiques. Ceci entraîne plusieurs maladies chroniques entretenues par les agents persistants. Le foyer infectieux initial est habituellement le col de l'utérus avec, comme manifestation clinique, la cervicite. L'urétrite est moins commune chez la femme. Il se passe souvent

plusieurs mois, voire des années, entre l'infection primaire et l'apparition de séquelles chroniques.

Des infections asymptomatiques à *C. trachomatis*, avec principalement une évolution vers la chronicité, chez la femme peuvent conduire à une endométrite, une salpingo-ovarite, une périappendicite, une périhépatite (syndrome de Fitz-Hugh-Curtis), une péritonite et une arthrite réactionnelle. Cette forme d'arthrite est aussi connue chez l'homme comme arthrite réactionnelle post-urétrite.

Des salpingo-ovarites répétées peuvent souvent conduire à une infertilité. Chez l'homme des infections ascendantes suite à une urétrite asymptomatique peuvent conduire à une épидidymite et à une prostatite. La réduction de la fertilité masculine due à l'infection par *C. trachomatis* est aussi débattue.

L'agent pathogène périphérique *C. trachomatis* peut être détecté avec une grande sensibilité et spécificité par des méthodes de laboratoire tels que ELISA, Immunofluorescence, PCR, LCR. Cependant, des infections à *C. trachomatis* non diagnostiquées ou insuffisamment traitées conduisent souvent à des manifestations chroniques. La détection directe de l'agent pathogène est alors difficile. Ici, la détection des anticorps IgA en association avec les anticorps IgG joue un rôle décisif.

Les Chlamydiae contiennent des antigènes immunodominants communs tels qu'un antigène de groupe de nature lipopolysaccharidique (LPS). Pour réaliser la sérologie spécifique de l'espèce *C. trachomatis* il est nécessaire, d'avoir des structures immunogéniques. Ces structures sont localisées dans la zone variable de la principale protéine de la membrane extérieure (MOMP).

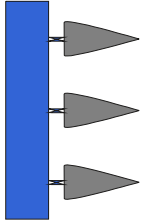
Jusqu'à présent, le test de microimmunofluorescence (MIF) a été considéré comme le test de référence de la sérologie spécifique à l'espèce. Les antigènes utilisés étaient des corps élémentaires totaux fixés. Par conséquent, une réactivité croisée entre les espèces ne pouvait pas être exclue.

La méthode *C. trachomatis*-pELISA medac utilise un peptide synthétique provenant de la région dominante de la MOMP. Avec cet antigène très spécifique, il est possible de distinguer les anticorps spécifiques du *C. trachomatis* des anticorps totaux anti-Chlamydiae avec une grande spécificité.

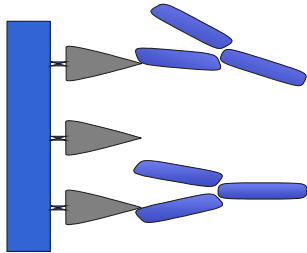
La sérologie est une méthode de choix dans les infections qui évoluent principalement vers la chronicité.

Ici, la détection des anticorps IgA en association avec les anticorps IgG joue un rôle décisif. La sérologie est aussi indiquée comme méthode supplémentaire pour le diagnostic d'infections périphériques suspectées à *C. trachomatis* et pour le suivi après traitement.

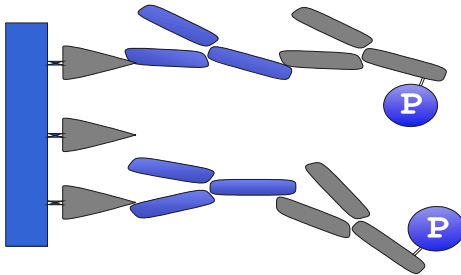
PRINCIPE DU DOSAGE



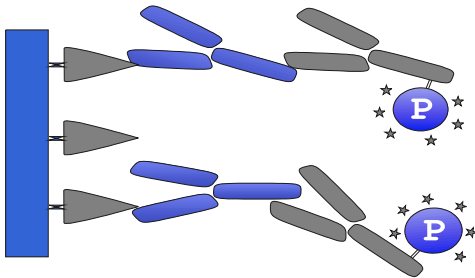
La plaque est revêtue avec le peptide synthétique spécifique de *C. trachomatis*.



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



Les anticorps anti-IgG humains conjugués à la peroxydase vont se lier aux anticorps IgG (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

- ☞ Pas de résultats faux positifs par réaction croisée avec d'autres chlamydiae.
- ☞ Antigène non infectieux.
- ☞ Structure chimique définie de l'antigène.
- ☞ Micropuits sécables permettant l'utilisation efficace du test.

CONTENU DE LA TROSSE

Réf.: 497-TMB

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits en U, de couleur violette (avec support et déshydratant, dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, revêtus de peptide synthétique spécifique de *C. trachomatis* et avec du sérum de veau nouveau-né, prêts à l'emploi.
2.

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

Contrôle négatif: 1 flacon de 1,5 ml, 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: 1 flacon de 1,5 ml, 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, avec 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 4,5 ml chacun contenant une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort (HRP). Prête à l'emploi, couleur verte. 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 11 ml chacun contenant du H₂SO₄ 0,5 M, prête à l'emploi.

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

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 échantillon, le tampon de lavage, le substrat-TMB, 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. ECHANTILLON

4.1. Le test est à utiliser avec des échantillons sériques.

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

4.3. Les échantillons doivent être dilués au 1/50 avec le diluant pour échantillons. Ils peuvent être dilués davantage pour la détermination du titre.

5.A. PROCEDURE DE DOSAGE

5.1. 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.

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

5.3. 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.

5.4. 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!

5.5. Ajouter le conjugué (vert) 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.

5.6. 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.

5.7. Après incubation, laver les puits de nouveau (voir 5.4).

5.8. Ajouter 50 µl 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.

5.9. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl 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.B. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon
Diluant pour échantillons	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				
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				
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 5.5.)

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 du contrôle négatif + 0,340.**
- * **Zone grise = cut-off ± 10%**

Refaire la série si les résultats ne rencontrent pas les spécifications!

6.B. INTERPRÉTATION DES RESULTATS:

6.B.1. QUALITATIVE

Résultat	Interprétation
D.O. < Zone grise	négatif
D.O. = Valeur seuil \pm 10%	douteux
D.O. > Zone grise	positif

6.B.2. QUANTITATIVE

Index cut-off $\frac{\text{D.O.Echantillon}}{\text{D.O.cut-off}}$	Interprétation
< 0,9	négatif
0,9 - 1,1	douteux
> 1,1	positif

- * Des échantillons qui ont des valeurs 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 IgA et les données cliniques et autres paramètres diagnostiques.
- * Des concentrations élevées d'hémoglobine, de bilirubine et de lipides dans le sérum, n'ont pas d'influence sur les résultats.

6.C. INTERPRÉTATION SPECIFIQUE IgG/IgA POUR LE SERUM

Résultats Possibles		Interprétation
IgG	IgA	
+	+	1. IgG et IgA positives; indication d'infection. L'interprétation finale dépendra des symptômes et de l'évolution du titre.
+	-	2. Seul IgG positive; indication d'infection passée ou persistante. En cas de suspicion clinique déterminer une augmentation (x4) du titre d'IgG entre deux échantillons et doser de nouveau les IgA.
+	+/-	3. IgG positive, IgA zone grise; possibilité d'infection récente ou réactivée ou diminuée; doser de nouveau les IgA après 10 - 14 jours.
+/-	-	4. Uniquement des IgG en zone grise; une infection passée ou persistante ne peut pas être exclue. En cas de suspicion clinique, doser de nouveau les IgG et IgA après 10 - 14 jours.
-	+	5. Uniquement positif pour IgA; possibilité d'un stade précoce d'infection ou d'IgA persistantes; doser de nouveau les IgA et IgG après 10 - 14 jours.
-	+/-	6. Uniquement des IgA en zone grise; possibilité d'un stade très précoce d'infection; doser de nouveau IgA et IgG après 10 - 14 jours.
+/-	+	7. IgG en zone grise, IgA positive; possibilité d'un stade précoce d'une infection; doser de nouveau les IgA et IgG après 10 - 14 jours.
-	-	8. IgG et IgA négatives; n'indique pas d'infection. Dans le cas de suspicion clinique justifiée, une détection directe d'antigène devrait être réalisée, ainsi qu'un nouveau dosage d'IgA et IgG après 10 - 14 jours.

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 10 - 14 jours pour déterminer l'existence de séroconversion.

7. PERFORMANCES DU DOSAGE

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

7.A. SPECIFICITE ET SENSIBILITE

Des échantillons provenant d'enfants âgés de moins de 10 ans et des patients avec infection à *C. pneumoniae* prouvée par sérologie (MIF), ont été mesurés pour **déterminer la spécificité**.

Des sérums provenant de trois différents groupes de patients ont été dosés pour **déterminer la sensibilité/prévalence**.

Groupe de patient	Spécificité	
	IgA	IgG
Enfant < 10 ans Patients avec infection à <i>C.pneumoniae</i> (MIF positifs)	98% (n=100) 100% (n=47)	99% (n=100) 100% (n=47)
Patients MST <i>C.trachomatis</i> Culture négative pour <i>C.trachomatis</i>	Sensibilité/Prévalence	
	6,2% (n=112)	25,0% (n=96)
<i>C.trachomatis</i> MIF	3,6%(n=112)	27,1% (n=96)
Patients MST <i>C.trachomatis</i> Culture positive pour <i>C.trachomatis</i>	24,6%(n=114)	65,1% (n=106)
	<i>C.trachomatis</i> MIF	20,2%(n=114)
Donneurs de sang	<i>C.trachomatis</i> pELISA 6,4%(n=299)	15,1% (n=299)
Patients atteints d'arthrite*	<i>C.trachomatis</i> pELISA 41,0% (n=83)	48,2% (n=83)

*Les sérums ont été présélectionnés par rapport à un résultat IgG positif avec la trousse Chlamydia rELISA.

7.B. PRECISION

Echan- tillon	Répétabilité				Echan- tillon	Reproductibilité (n = 13)		
	moy DO	DS	CV (%)	n		moy DO	DS	CV (%)
NC	0,037	0,005	13,2	21	NC	0,038	0,011	30,4
BC	0,653	0,034	5,2	21	BC	0,371	0,045	12,0
PC	1,789	0,061	3,4	21	PC	1,502	0,094	6,2
N°1	0,050	0,009	17,2	21	N°3	1,724	0,102	5,9
N°2	2,111	0,064	3,0	24	N°4	0,525	0,070	13,4

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: 21.09.2007

LITERATUR/REFERENCES/LITTÉRATURE

Christiansen, G., Pedersen, L., Clausen, J.D., Birkelund, S.: Cell and molecular biology of Chlamydia. In: Chlamydia Research. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11.-14. September. pp. 3-6 (1996).

DeSchreyer, A., Meheus, A.: Epidemiology of sexually transmitted diseases: The global picture. Bull. World Health Organization 68, 639-654 (1990).

Hoyme, U.B., Spitzbart, H.: Past and current prevalence of **Chlamydia trachomatis** in women in Germany. In: Chlamydia Research. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria 11-14 September. p. 391 (1996).

Keck, C., Gerber-Schafer, C., Clad, A., Wilhelm, C., Breckwoldt, M.: Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. Hum. Reprod. Update 4(6), 891-903 (1998).

Köhler, M., Jendro, C. (1997). Bedeutung der Persistenz von **Chlamydia trachomatis** im Gelenk für die Pathogenese der Chlamydien-induzierten Arthritis unter Berücksichtigung der therapeutischen Implikationen. Akt. Rheumatol. 22, 170-175 (1997).

Land, J.A., Evers, J.L., Goossens, J.V.: How to use Chlamydia antibody testing in subfertility patients. Hum. Reprod. 13, 1094-1098 (1998).

Nickel, J.C.: Chronic Prostatitis: An infectious disease? Infect. Urol. 13(2), 31-38 (2000).

Ochsendorf, F.R., Ozdemir, K., Rabenau, H., Fenner, T., Oremek, R., Milbradt, R., Doerr, H.W.: **Chlamydia trachomatis** and male infertility: chlamydia-IgA antibodies in seminal plasma are **C. trachomatis** specific and associated with an inflammatory response. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 12(2), 143-152 (1999).

Paavonen, J.: **Chlamydia trachomatis**: A major cause of mucopurulent cervicitis and pelvic inflammatory disease in women. In: Sexually Transmitted Diseases. Advances in Diagnosis and Treatment. Curr. Probl. Dermatol. Elsner. P., Eichmann, A. (eds.). Basel, Karger, 24, 110-122 (1996).

Patton, D., Askienazy-Elbhar, M., Henry-Suchet, J., Campbell, L.A., Cappucio, A., Tannous, W., Wang, S.-P., Kuo, S.-C.: Detection of **Chlamydia trachomatis** in fallopian tube tissue in women with post-infectious tubal infertility. Am. J. Obstet. Gynecol. 171, 95-101 (1994).

Petersen, E.E., Clad, A.: Genitale Chlamydieninfektionen. Deutsches Ärzteblatt 92, A-277-282 (1995).

Petersen, E.E., Clad, A., Mendel, R., Prillwitz, J., Hintz, K.: Prevalence of chlamydial infections in Germany: Screening of asymptomatic women and men by testing first void urine by ligase chain reaction (LCR). In: Chlamydia Research. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11-14 September. p. 415 (1996).

Saikku, P.: Diagnosis of acute and chronic **Chlamydia pneumoniae** infections. In: Chlamydial Infections. Orfila, J., Byrne, G.I., Chernesky, M.A., Grayston, J.T., Jones, R.B., Ridgway, G.L., Saikku, P., Schachter, J., Stamm, W.E., Stephens, R.S. (eds.). Proceedings of the Eighth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Chateau de Montvillargenne, 60270 Gouvieux-Chantilly, France, 19-24 June. p. 163-170 (1994).

Schachter, J.: The intracellular life of Chlamydia. Curr. Top. Microbiol. Immun. 138, 109-39 (1988).

Schachter, J.: Evolution of diagnostic tests for **Chlamydia trachomatis** infections. In: Chlamydia Research. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11-14 September. pp. 243-146 (1996).

Schuppe, H.C., Bispink, G., Peet, D.J., Propping, D., Böttcher, M., Dettlaff, S.: The significance of antibodies against **C. trachomatis** in seminal plasma. IVth European Chlamydia Congress, 2000 Helsinki, im Druck

Ward, M.E.: The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. APMIS 103, 769-796 (1995).

Weström, L.V.: Chlamydia and its effect on reproduction. J. Brit. Fertil. Soc. 1, 23-30 (1996).

Wolff, H.: The biologic significance of white blood cells in semen. Fertil. Steril. 63(6), 1143-1157 (1995).

Wolff, H., Neubert, U., Zebhauser, M., Bezold, G., Korting, H.C., Meurer, M.: **Chlamydia trachomatis** induces an inflammatory response in the male genital tract and is associated with altered semen quality. Fertil. Steril. 55(5), 1017-1019 (1991).

Wollenhaupt, J., Zeidler, H.: Klinik, Diagnostik und Therapie der Chlamydien-induzierten Arthritis. Akt. Rheumatol. 22, 176-182 (1997).