

Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA *plus* 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. 14
Français: p. 27

Literatur/References/Littérature: S./p./p. 40

Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac

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

Katalog-Nr.: 497-PLUS

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 bakteriellen 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 19 verschiedenen Serotypen auf, die unterschiedlichste Krankheitsbilder hervorrufen. Die Serotypen A-C sind verantwortlich für das endemische Trachom, das nach Jahren 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 in den meisten Fällen 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 ist auch beim Mann als sogenannte posturethritische Arthritis bekannt.

Als Folge wiederholter Adnexitiden verkleben die Tuben, was häufig zu infektionsbedingter Sterilität führt. Beim Mann ascendieren die Erreger nach nicht ausgeheilter Urethritis in den Nebenhoden (→ Epididymitis) und z. T. auch in die Prostata (→ Prostatitis). Hier induzieren sie inflammatorische Reaktionen, in deren Folge die Motilität der Spermien und die Akrosomenreaktion negativ beeinflusst und schließlich die Befruchtungsfähigkeit vermindert wird.

Die Erreger einer peripheren **C. trachomatis**-Infektion können mit Direktnachweisen (ELISA, IFT) oder durch Nukleinsäure-Amplifikationstechniken wie z.B. PCR mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden.

Bei chronischen Krankheitsverläufen ist die Serologie die Methode der Wahl.

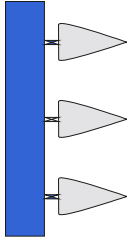
Als sogenannter „Goldstandard“ in der artspezifischen Serologie gilt bislang die Mikroimmunfluoreszenz (MIF). Bei der MIF handelt es sich um einen aufwendigen, subjektiv auszuwertenden Test, der viel Erfahrung erfordert. Die MIF ist nicht standardisiert. Verschiedene Antigenpräparationen und unterschiedliche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

In der gegenwärtigen Laborroutine dominiert die ELISA-Technik. Dabei hängt die Qualität der diagnostischen Aussage sowohl vom verwendeten Antigen als auch vom Auswerteverfahren der Ergebnisse ab. Der **Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac** arbeitet mit einem synthetischen Peptid einer variablen Domäne aus der immundominanten MOMP-Region (Major outer membrane protein = MOMP). Dieses hochspezifische Antigen wird auch im **C. trachomatis-IgA-ELISA plus medac** eingesetzt.

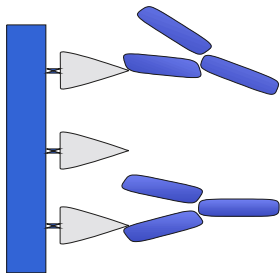
Der Nachweis von IgA- und IgG-Antikörpern gegen **C. trachomatis** erlaubt einen Hinweis auf das Infektionsgeschehen.

Darüber hinaus bietet die medac-Einpunktquantifizierung (AU/ml) die beste Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse und damit auch für die Messung von Antikörperverläufen.

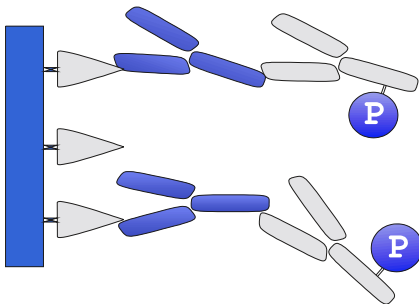
TESTPRINZIP



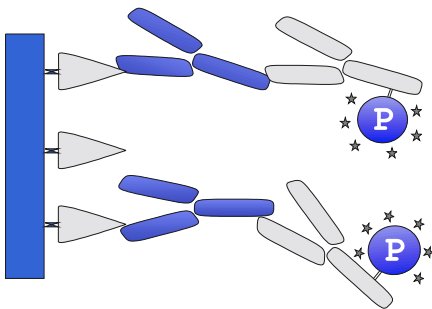
Mit *C. trachomatis*-spezifischem, synthetischem Peptid beschichtete Mikrotiterplatte.



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.
- ☞ Einpunktquantifizierung, keine Standardkurve mehr nötig.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.

PACKUNGSINHALT

KAT.-NR.: 497-PLUS

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.

CAL

Kalibrator: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
5.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
6.

BAC-DIL

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

CON

Konjugat: 3 Fläschchen à 4,5 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, grün gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
8.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
9.

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

Evtl. im Waschpuffer (10x) 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, Kalibrator, 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.

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 (s. 6.A.) in die Vertiefung A1 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettieren. Jeweils 50 µl der negativen Kontrolle, der positiven Kontrolle sowie der Proben in Einfachbestimmung und 50 µl des Kalibrators in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Platte pipettieren.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung max. 30 min bei RT gelagert werden.

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 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 Gerätesystemen zu verifizieren.

- 5.6. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 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 (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 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	Kalibrator	Probe
Probenverdünnungs- puffer	50 µl	-	-	-	-
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-	-
Kalibrator	-	-	-	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*)	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	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren					
Stopplösung	100 µl	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 Auswertung erfolgt quantitativ in willkürlichen Einheiten (AU/ml).
- * 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.
- * Chargenspezifische Daten

Dem Test liegt ein chargenspezifisches Datenblatt bei. Diesem können folgende Angaben entnommen werden:

- chargenspezifische Standardkurve
- Kurvenparameter a und b
- OD-Sollwert des Kalibrators
- unterer Grenzwert für die OD des Kalibrators
- Sollbereich in AU/ml für die positive Kontrolle

* Validitätskriterien

- Der OD-Wert des **Leerwertes** muß < **0,100** betragen.
- Der OD-Wert der **negativen Kontrolle** muß < **0,100** betragen.
- Der Unit-Wert der **positiven Kontrolle** muß innerhalb des Sollwertbereiches gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.
- Der OD-Mittelwert des **Kalibrators** muß oberhalb des Grenzwertes gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.

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

* Korrektur der Meßergebnisse

Die OD-Werte für die positive Kontrolle und die Patientenproben werden wie folgt korrigiert:

$$OD_{\text{korrigiert}} = \frac{\text{OD-Sollwert des Kalibrators}}{\text{OD-Meßwert des Kalibrators}} \times OD_{\text{gemessen}}$$

* Quantifizierung der Meßergebnisse

Für die korrigierten OD-Werte sind die korrespondierenden Konzentrationen in AU/ml aus der Standardkurve auf dem chargenspezifischen Datenblatt zu ermitteln.

Alternativ lassen sich die Konzentrationen auch mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Konzentration [AU/ml]} = b \left(\frac{a}{OD_{\text{korrigiert}}} - 1 \right)$$

Die meisten ELISA-Photometer neuerer Bauart gestatten die Eingabe dieser Formel, so daß eine direkte Auswertung mittels Photometer möglich ist.

Der Meßbereich erstreckt sich von 22 bis 200 AU/ml. Proben mit Unit-Werten unterhalb des Meßbereiches sind als < 22 AU/ml zu bewerten, solche oberhalb als > 200 AU/ml. Diese dürfen nicht extrapoliert werden.

Der Cut-off liegt bei 25 AU/ml.

Grenzbereich = 22 - 28 AU/ml.

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

* Proben mit Unit-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.

* Proben mit Unit-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet.

Diese Werte sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe gemessen wird.

* Proben mit Unit-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** bewertet.

* 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

Mögliche Ergebnisse		Interpretation
IgA AU/ml	IgG AU/ml	
>28	<22	1. Serologischer Hinweis auf ein frühes Infektionsstadium oder solitär persistierendes IgA ¹ . Überprüfung des IgA und IgG nach 14 Tagen.
>28	>28	2. Serologischer Hinweis auf eine bestehende Infektion ² . Überprüfung des IgA und IgG nach 14 Tagen.
<22	>28	3. Serologischer Hinweis auf eine zurückliegende Infektion. Bei klinischem Verdacht nach 14 Tagen auf IgA- und IgG-Antikörperbewegungen überprüfen.
<22	<22	4. Kein serologischer Hinweis auf eine bestehende oder abgelaufene Infektion ³ . Bei klinischem Verdacht nach 14 Tagen auf IgA und IgG überprüfen.

¹ in Einzelfällen können solitäre IgA-Antikörper persistieren. Dieses immunologische Phänomen tritt bei verschiedenen bakteriellen Infektionen auf. Eine klinische Relevanz ist nicht beurteilbar.

² Eine bestehende Infektion kann bedeuten:

- chronische Infektion mit persistierenden Erregern: Die Unit-Werte für die Antikörper bleiben über Wochen konstant.
- akute Infektion: Die Unit-Werte für die Antikörper steigen an. Ein zweifacher Anstieg des Unit-Wertes gilt als statistisch signifikant erhöht.

³ Bei frischen, akuten **C. trachomatis**-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.

Hinweis:

Grenzwertige Ergebnisse können auf beginnende oder abklingende Infektionsstadien hinweisen. Eine Überprüfung nach 14 Tagen wird empfohlen.

7. LEISTUNGSMERKMALE

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

7.A. SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT

Im Rahmen der diagnostischen Erprobung wurden 327 Proben im Vergleich zum Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac gemessen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Neun-Felder-Tafel dargestellt:

C. trachomatis-IgG-pELISA medac

C. trachomatis IgG-ELISA plus medac		negativ	grenzwertig	positiv
	negativ	172	5	2
	grenzwertig	4	8	6
	positiv	2	0	128

Sensitivität = 94%
Spezifität = 97%
Übereinstimmung = 94%

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	Ø AU/ml	S	VK (%)	n		Ø AU/ml	S	VK (%)
PK	41,1	1,0	2,4	22	PK	40,5	1,4	3,5
1	4,8	0,3	7,0	22	5	9,2	0,4	4,6
2	50,7	2,5	5,0	22	6	49,8	1,6	3,1
3	90,1	4,2	4,6	22	7	97,0	4,1	4,2
4	109,7	5,4	4,9	22	8	151,3	9,2	6,1

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 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: 01.04.2007

Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac

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

Cat. no.: 497-PLUS

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 energyrich 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 bacterial 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 19 serovars causing different clinical manifestations. Serovars A-C are responsible for the endemic trachoma, an ocular disease, which may lead to blindness after years. 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. Subsequent to a peripheral infection in most of the cases cervicitis will develop. 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 with mainly chronic course in women may lead to endometritis, adnexitis, periappendicitis, perihepatitis, peritonitis and reactive arthritis. This latter arthritis form is also known in men as so-called post-urethritic arthritis.

Repeated adnexitis may often lead to infertility. In men, ascending infections following asymptomatic urethritis may result in epididymitis and prostatitis. The corresponding inflammatory processes may influence the motility of sperms and the acrosome reaction in a negative way, which results in reduced fertility.

Peripheral *C. trachomatis* pathogens can be detected with high sensitivity and specificity by laboratory methods, such as ELISA and IFT or by nucleic acid amplification techniques like PCR.

In chronic infections serology is method of choice. For the detection of species-specific antibodies the microimmunofluorescence (MIF) has been considered 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.

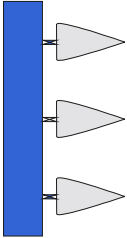
The ELISA technique is the favoured method in laboratory routine at this time. The quality of the diagnostic information depends as well on the employed antigen as on the method of diagnostic data interpretation. The **Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac** uses a synthetic peptide of a variable domain from an immunodominant region of the MOMP (major outer membrane protein = MOMP).

This highly specific antigen has also been employed in the **Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac**.

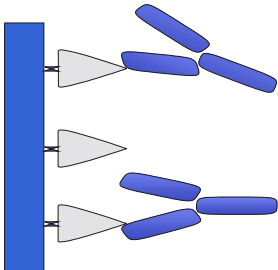
The detection of IgA and IgG antibodies to *C. trachomatis* allows a classification of the state of infection.

Moreover, the medac one-point quantification (AU/ml) provides the best preconditions for reproducible results and in this way for measuring of the antibody courses.

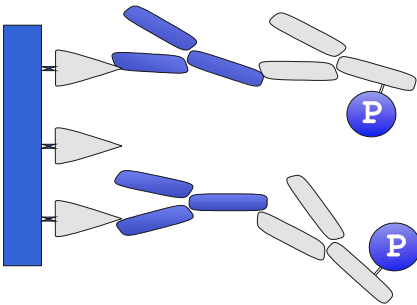
TEST PRINCIPLE



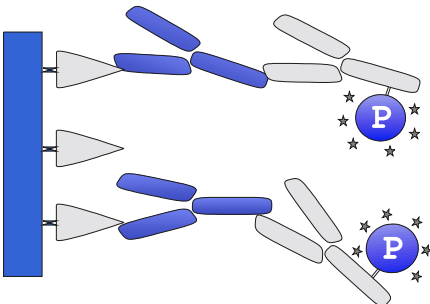
The plate is coated with synthetic *C. trachomatis*-specific peptide.



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 cross-reactivities with other chlamydiae.
- ☞ One-point-quantification, no standard curve needed.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 497-PLUS

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 gentamycin sulfate.
3.

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

Positive control: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
4.

CAL

Calibrator: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
5.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
6.

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.
7.

CON

Conjugate: 3 vials with 4.5 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready to use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
8.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
9.

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

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

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, calibrator, 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.

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 pre-washed.

5.2. Pipette 50 µl sample diluent into well A1 as blank (see 6.A.). Add 50 µl each of the negative control, the positive control as well as the diluted samples in single determination, and 50 µl of the calibrator in duplicate to the wells.

If necessary the microplate wells can be kept up to 30 min at RT before proceeding.

5.3. Incubate the microplate wells for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 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 must be done within 15 min after adding the stop solution!

5.B. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Calibrator	Sample
Sample diluent	50 µl	-	-	-	-
Neg. control	-	50 µl	-	-	-
Pos. control	-	-	50 µl	-	-
Calibrator	-	-	-	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*)	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	50 µl
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark					
Stop solution	100 µl	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)

- * The evaluation is performed using arbitrary units (AU/ml).
- * 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.
- * Lot-specific data

The lot-specific data sheet provided with the kit contains the following information:

- Lot-specific calibration curve
- Curve parameters a and b
- Nominal OD value of the calibrator
- Lower OD limit of the calibrator
- Nominal concentration range (AU/ml) of the positive control

* Validity criteria

- The OD value of the **blank** has to be < **0.100**.
- The OD value of the **negative control** has to be < **0.100**.
- The unit value of the **positive control** has to be within the nominal range indicated in the lot-specific data sheet.
- The mean OD value of the **calibrator** has to be above the lower OD limit indicated in the lot-specific data sheet.

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

* Correction of the results

The measured OD values of the positive control and the samples have to be corrected as follows:

$$OD_{\text{corrected}} = \frac{\text{Nominal OD value of the calibrator}}{\text{Measured OD value of the calibrator}} \times OD_{\text{measured}}$$

* Quantification of the results

The corresponding concentrations of the corrected OD values in AU/ml can be read from the lot-specific calibration curve (see lot-specific data sheet).

Alternatively, the concentrations can be calculated using the following formula:

$$\text{Concentration [AU/ml]} = b \left(\frac{a}{OD_{\text{corrected}}} - 1 \right)$$

Most of the new ELISA readers allow to program the formula, thus enabling an automated data processing.

The measuring range spans from 22 to 200 AU/ml. Samples below this range have to be interpreted as < 22 AU/ml, those above as > 200 AU/ml. These values must not be extrapolated.

The cut-off is 25 AU/ml.

Grey zone = 22 - 28 AU/ml.

6.B. INTERPRETATION OF RESULTS/LIMITATIONS OF THE METHOD

* Samples with Unit values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE**.

* Samples with Unit values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.

These samples should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.

* Samples with Unit values exceeding the upper limit of the grey zone are reported as **POSITIVE**.

* The results should always be interpreted in connection with IgA and clinical data and additional diagnostic parameters.

* High concentrations of hemoglobin, of bilirubin, and of lipids in serum do not have an influence on the results.

6.C. SPECIFIC IgA-/IgG-INTERPRETATION

Possible results		Interpretation
IgA AU/ml	IgG AU/ml	
>28	<22	1. Serological indication of early stage of infection or solitary, persisting IgA. ¹ . Retest IgA and IgG after 14 days.
>28	>28	2. Serological indication of current infection ² . Retest IgA and IgG after 14 days.
<22	>28	3. Serological indication of past infection. In case of clinical suspicion retest after 14 days for IgA and IgG antibody courses.
<22	<22	4. No serological indication of current or past infection ³ . In case of clinical suspicion retest after 14 days for IgA and IgG antibodies.

¹ In individual cases solitary IgA antibodies may persist. This immunological phenomenon appears in different bacteriological infections. A clinical relevance is not appraisable.

² A current infection may stand for:
 - chronic infection with persisting pathogens: The unit values of the antibodies remain constant for several weeks.
 - acute infection: The unit values for the antibodies increase. A twofold increase of the unit value is considered as statistically significant elevated.

³ In cases of fresh acute *Chlamydia trachomatis* 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.

Comment:

Borderline results may indicate commencing or subsiding infections. Retesting after 14 days is recommended.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation

7.A. SPECIFICITY AND SENSITIVITY

327 samples were measured in comparison to the Chlamydia trachomatis-IgG-pELISA medac.

The results are shown in the following nine-square table:

C. trachomatis-IgG-pELISA medac

C. trachomatis-IgG-ELISA plus medac		negative	borderline	positive
	negative	172	5	2
	borderline	4	8	6
	positive	2	0	128

Sensitivity = 94%
 Specificity = 97%
 Concordance = 94%

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay Variation				Sample	Inter-assay Variation (n = 11)		
	Ø AU/ml	SD	CV (%)	n		Ø AU/ml	SD	CV (%)
PC	41.1	1.0	2.4	22	PC	40.5	1.4	3.5
1	4.8	0.3	7.0	22	5	9.2	0.4	4.6
2	50.7	2.5	5.0	22	6	49.8	1.6	3.1
3	90.1	4.2	4.6	22	7	97.0	4.1	4.2
4	109.7	5.4	4.9	22	8	151.3	9.2	6.1

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: 01.04.2007

Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac

Immunoessai enzymatique pour la détection quantitative des anticorps
IgG anti-*Chlamydia trachomatis*

Cat. No.: 497-PLUS

DESTINEE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

INTRODUCTION

Les Chlamydiae sont des bactéries pathogènes gram-négatives. Elles possèdent un cycle vital intracellulaire obligatoire dans les 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 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 infections bactériennes sexuellement transmissibles du tractus urogénital et des yeux. Pendant l'accouchement, *C. trachomatis* peut être transféré à l'enfant et provoquer une conjonctivite néonatale et une pneumonie.

C. trachomatis est subdivisé en 19 sérotypes provoquant différentes manifestations cliniques. Les sérotypes A - C sont responsables du trachome endémique, une maladie oculaire qui peut conduire à la cécité après des années. Il affecte des centaines de millions des personnes dans les pays en voie de développement. La lymphogranulomatose vénérienne, une maladie tropicale sexuellement transmissible, est le résultat d'infections avec les sérotypes L₁ - L₃. Dans les pays industrialisés, les sérotypes D - 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 de nombreuses maladies chroniques entretenues par la progression des agents persistants. Consécutivement

à une infection périphérique une cervicite va se développer dans la plupart des cas. L'urétrite est moins commune chez la femme. Entre l'infection primaire et l'apparition de séquelles chroniques il se passe souvent plusieurs mois ou années.

Des infections asymptomatiques à *C. trachomatis*, avec principalement une évolution chronique chez la femme peuvent conduire à l'endométrite, l'annexite, la périappendicite, la périhépatite, la péritonite et l'arthrite réactionnelle. Cette forme d'arthrite est aussi connue chez l'homme comme arthrite réactionnelle post-urétrite.

Des annexites répétées peuvent souvent conduire à l'infertilité. Chez l'homme des infections ascendantes suite à une urétrite asymptomatique peuvent conduire à une épидидymite et à une prostatite. Le processus inflammatoire correspondant peut influencer, dans un sens négatif, la mobilité du sperme et la réaction de l'acrosome, conduisant ainsi à une réduction de la fertilité.

Les pathogènes périphériques *C. trachomatis* peuvent être détectés avec une grande sensibilité et spécificité par des méthodes de laboratoire tels que l'ELISA et l'Immunofluorescence ou par des techniques d'amplification d'acides nucléiques comme la PCR.

Dans les infections chroniques, la sérologie est la méthode de choix. Pour la détection des anticorps spécifiques d'espèce, la microimmunofluorescence (MIF) a été considérée comme le "Gold standard". La MIF est laborieuse, subjective et nécessite beaucoup d'expérience. Ce test n'est pas standardisé; l'utilisation de différents antigènes et de différents critères de cut off pour les infections passées et récentes ou en cours crée des variations inter laboratoires significatives des résultats.

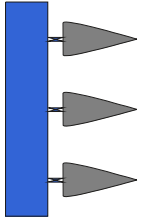
La technique ELISA est la méthode favorite en laboratoire de routine à ce moment. La qualité de l'information diagnostique dépend autant de l'antigène employé que de l'interprétation des données de la méthode de diagnostic. Le **Chlamydia trachomatis-IgG-ELISA plus medac** utilise un peptide synthétique d'une partie variable d'une région immunodominante du MOMP (major outer membrane protein = MOMP).

Cet antigène hautement spécifique a aussi été utilisé dans le **Chlamydia trachomatis-IgA-ELISA plus medac**.

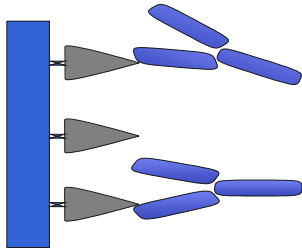
La détection des anticorps IgA et IgG anti *C. trachomatis* permet une classification de l'état de l'infection.

De plus, la quantification en un point (AU/ml) procure les meilleures conditions pour des résultats reproductibles et de ce fait pour mesurer l'évolution des anticorps.

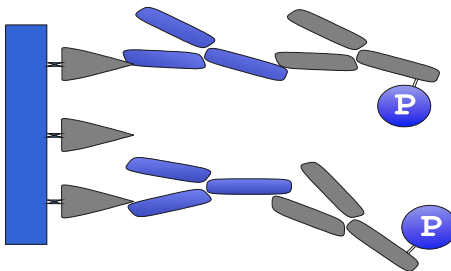
PRINCIPE DU DOSAGE



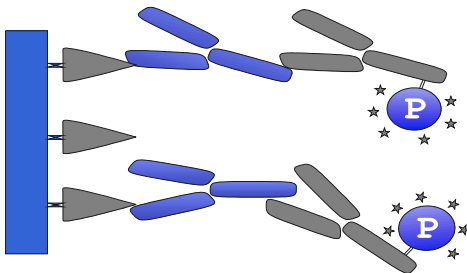
La plaque est revêtue avec le peptide synthétique spécifique de *C. trachomatis*.



Les anticorps spécifiques anti-*C. trachomatis*, de l'échantillon, se lient 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 test

- ☞ Pas de résultats faux positifs par réaction croisée avec d'autres chlamydiae.
- ☞ Quantification en un point, pas de courbe standard nécessaire.
- ☞ Micropuits sécables permettant l'utilisation optimale du test.

CONTENU DE LA TROUSSE

Réf.: 497-PLUS

1.

MTP

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

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

Contrôle négatif: 1 flacon de 1,5 ml, sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contient du sérum de veau nouveau-né, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
3.

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

Contrôle positif: 1 flacon de 1,5 ml, sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contient de la SAB, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
4.

CAL

Calibrateur: 1 flacon de 1,5 ml, sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contient de la SAB, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
5.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, tampon PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, contenant du ProClin™ 300.
6.

BAC-DIL

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

CON

Conjugué: 3 flacons de 4,5 ml chacun, anti-IgG humaines de chèvre, conjuguées à de la peroxydase du raifort (HRP), prête à l'emploi, de couleur verte, contient de la SAB, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
8.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.
9.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 11 ml chacun, acide sulfurique (H₂SO₄) 0,5 M, prêt à l'emploi.

1. CONSERVATION ET STABILITE

MATERIEL/REACTIFS	ETAT	CONSERVATION	STABILITE
Trousse	non ouvert	2 - 8 °C	jusqu'à la date de péremption
Microplaque	ouvert	2 - 8 °C dans le sachet avec déshydratant	12 semaines
Contrôles/ calibrateur	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 la date de péremption

Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.

2. REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- 2.1. Eau pour injection (H₂O bidistillée). L'utilisation d'eau désionisée peut perturber la procédure du test.
- 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 laveur ELISA).
- 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, avec le deshydratant, après chaque retrait de 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 (10x) avec neuf volumes d'eau pour injection [ex. 50 ml de tampon de lavage (10x) avec 450 ml d'eau]. 10 ml de tampon dilué sont nécessaires pour 8 puits.

Des cristaux dans le tampon de lavage (10x) doivent être dissous en chauffant (max. 37 °C) et/ou en agitant, à température ambiante.

Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôles, calibrateur, 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. ECHANTILLONS

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

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

4.3. Les échantillons sériques doivent être dilués au 1/50 avec le diluant pour échantillon.

5.A. PROCEDURE DE DOSAGE

5.1. Couper le sachet d'aluminium au-dessus de la fermeture à glissière et extraire le nombre de puits nécessaire (voir 3.1.).

Les puits sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être prélavés.

5.2. Distribuer 50 µl de diluant pour échantillons dans le puits blanc A1 (voir 6.A.). Ajouter 50 µl de contrôle négatif, de contrôle positif, de même que les échantillons dilués en simple et 50 µl de calibrateur en double dans les puits.

Si nécessaire la plaque peut être conservée 30 min à TA avant de procéder au test.

- 5.3. Incuber la microplaque pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte d' un film pour incubation.
- 5.4. Après incubation, laver les puits trois fois avec 200 μ l de tampon de lavage dilué par puit. Vérifier que tous les puits soient 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 (de couleur verte) dans chaque puit.

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

Attention:

Si la procédure est réalisée sur automate, il faut distribuer 60 μ l de conjugué dans chaque puits, en raison de l'évaporation élevée dans les incubateurs de ces appareils.

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 à nouveau la microplaque, pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte d' un film pour incubation.
- 5.7. Après incubation, laver les puits à nouveau (voir 5.4).
- 5.8. 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 d' un film pour incubation dans l'obscurité. Les échantillons positifs deviennent bleus.
- 5.9. 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.B. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Calibrateur	Echantillon
Diluant pour échantillons	50 µl	-	-	-	-
Contrôle négatif	-	50 µl	-	-	-
Contrôle positif	-	-	50 µl	-	-
Calibrateur	-	-	-	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*)	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	50 µl
Incuber pendant 30 min à 37 °C dans l'obscurité					
Solution d'arrêt	100 µl	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)

- * L'analyse est réalisée en utilisant des unités arbitraires (AU/ml).
- * Lire les valeurs de DO à 450 nm (longueur d'onde de référence 620 - 650 nm).
- * Soustraire la valeur de DO du puits blanc (puits A1) de toutes les autres valeurs de DO
- * Données spécifiques du lot

La feuille des données spécifiques du lot fournie avec le contenu du kit donne les informations suivantes:

- La courbe de calibration spécifique du lot.
- Les paramètres de courbe a et b.
- La valeur nominale de DO du calibrateur.
- La DO limite inférieure du calibrateur.
- L'étendue nominale de concentration (AU/ml) du contrôle positif.

* Critères de validité

- La valeur de DO du **blanc** doit être < 0,100.
- La valeur de DO du **contrôle négatif** doit être < 0,100.
- La valeur en unités du **contrôle positif** doit être dans l'écart nominal indiqué dans la feuille de données spécifiques du lot.
- La valeur moyenne de DO du **calibrateur** doit être au-dessus de la valeur minimale indiquée dans la feuille de données spécifiques du lot.

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

* Correction des résultats

Les DO mesurées du contrôle positif et des échantillons doivent être corrigés comme ci-après:

$$DO_{\text{corrigée}} = \frac{\text{Valeur DO nominale du calibrateur}}{\text{Valeur DO mesurée du calibrateur}} \times DO_{\text{mesurée}}$$

* Quantification des résultats

Les concentrations correspondantes aux valeurs DO corrigées en AU/ml peuvent être lues à partir de la courbe de calibration spécifique du lot (voir feuille de données spécifiques du lot).

Alternativement, les concentrations peuvent être calculées en utilisant la formule suivante:

$$\text{Concentration [AU/ml]} = b \left(\frac{a}{DO_{\text{corrigée}}} - 1 \right)$$

La plupart des nouveaux lecteurs ELISA permettent de programmer la formule, donc de calculer les résultats automatiquement

L'étendue de mesure s'étend de 22 à 200 AU/ml. Les échantillons en-dessous de cet écart doivent être interprétés comme < 22 AU/ml, ceux au-dessus comme > 200 AU/ml. Ces valeurs ne peuvent pas être extrapolées.

Le cut-off est 25 AU/ml.

Zone grise = 22 - 28 AU/ml.

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS/LIMITES DE LA METHODE

* Les échantillons ayant des valeurs en unités inférieures à la limite inférieure de la zone grise sont rapportés comme **NEGATIFS**.

* Les échantillons ayant des valeurs en unités dans la zone grise sont rapportés comme **EQUIVOQUES**.

Ces échantillons devront être retestés en même temps qu'un nouvel échantillon prélevé 14 jours plus tard de manière à déterminer un changement de titre.

* Les échantillons ayant des valeurs en unités dépassant la limite supérieure de la zone grise sont rapportés comme **POSITIFS**.

* Les résultats devront toujours être interprétés en relation avec les IgA , les données cliniques et les paramètres complémentaires de diagnostic.

* De hautes concentrations d'hémoglobine, de bilirubine et de lipides dans le sérum n'ont pas d'influence sur les résultats.

6.C. INTERPRETATION SPECIFIQUE IgA/IgG

Résultats possibles		Interprétation
IgA AU/ml	IgG AU/ml	
>28	<22	1. Indication d'un stade précoce d'une infection ou présence d'IgA persistants et solitaires ¹ . Retester IgA et IgG après 14 jours.
>28	>28	2. Indication sérologique d'une infection en cours ² . Retester IgA et IgG après 14 jours.
<22	>28	3. Indication sérologique d'une infection passée. En cas de suspicion clinique retester l'évolution des anticorps IgA et IgG après 14 jours.
<22	<22	4. Pas d'indication sérologique d'une infection en cours ou passée ³ . En cas de suspicion clinique retester les anticorps IgA et IgG après 14 jours.

¹ Dans des cas individuels, des anticorps IgA solitaires peuvent persister. Ce phénomène immunologique apparaît dans différentes infections bactériennes. La signification clinique n'est pas connue.

² Une infection en cours concerne:

- une infection chronique avec des agents pathogènes persistants: les valeurs en unités des anticorps restent constantes pendant plusieurs semaines.
- infection aiguë: les valeurs en unités des anticorps augmentent. Une augmentation d'un facteur deux de la valeur est considérée comme statistiquement significative.

³ En cas d'infection récente aiguë à *Chlamydia trachomatis*, les résultats sérologiques d'anticorps peuvent être négatifs malgré des symptômes cliniques et une détection positive d'antigène. Si une confirmation sérologique d'un résultat positif d'antigène ou si un suivi sont désirés, nous recommandons de tester après 14 jours pour la séroconversion.

Commentaire:

Des résultats douteux peuvent indiquer des infections débutantes ou finissantes. Un retest après 14 jours est recommandé.

7. PERFORMANCES DU DOSAGE

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

7.A. SPECIFITE ET SENSIBILITE

327 séra ont été dosés en comparaison avec le chlamydia trachomatis-IgG-pElisa medac.

Les résultats sont montrés dans le tableau suivant:

C.trachomatis-IgG-pELISA medac

C. trachomatis IgG-ELISA plus medac		Négatif	Douteux	Positif
	Négatif	172	5	2
	Douteux	4	8	6
	Positif	2	0	128

Sensibilité = 94%

Spécificité = 97%

Concordance = 94%

7.B. PRECISION

Echan- tillon	Variation intra-essai				Echan- tillon	Variation inter-essai (n = 11)		
	AU/ml	SD	CV (%)	n		AU/ml	SD	CV (%)
CP	41,1	1,0	2,4	22	CP	40,5	1,4	3,5
1	4,8	0,3	7,0	22	5	9,2	0,4	4,6
2	50,7	2,5	5,0	22	6	49,8	1,6	3,1
3	90,1	4,2	4,6	22	7	97,0	4,1	4,2
4	109,7	5,4	4,9	22	8	151,3	9,2	6,1

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: 01.04.2007

LITERATUR/REFERENCES/LITTÉRATURE

Bax, C. J., Mutsaers, J. A. E. M., Jansen, C. L., Trimbos, J. B., Dörr, P. J., Oostvogel, P. M.: Comparison of serological assays for detection of ***Chlamydia trachomatis*** antibodies in different groups of obstetrical and gynaecological patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 70, 174-176 (2003).

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, September 11-14, pp. 3-6 (1996).

Fiddeleers, A.A.A., Land, J.A., Voss, G., Kessels, A.G.H., Severens, J.L.: Cost-effectiveness of Chlamydia antibody tests in subfertile women. Hum. Reprod. 20, 425-432 (2005).

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, September 11-14, p. 391 (1996).

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

Köhler, M., Jendro, C.: 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., Gijsen, A. P., Kessels, A.G.H., Slobbe, M.E.P., Bruggeman, C.A.: Performance of five serological Chlamydia antibody tests in subfertile women. Hum. Reprod. 18, 2621-2627 (2003).

Marrazzo, J.M., Johnson, R.E., Green, T.A., Stamm, W.E., Schachter, J., Bolan, G., Hook E.W., Jones, R.B., Martin, D.H., St. Louis, M.E., Black, C.M.: Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification tests and DNA probe for detection of ***Chlamydia trachomatis*** in women with genital infections. J. Clin. Microbiol. 43, 577-584 (2005).

Martin, D.H., Nsuami, M., Schachter, J., Hook, E.W., Ferrero, D., Quinn, T.C., Gaydos, C.: Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient „gold standard“ in clinical trials of new diagnostic tests for ***Chlamydia trachomatis*** infections. J. Clin. Microbiol. 42, 4749-4758 (2004).

Nickel, J.C.: Chronic Prostatitis: An infectious disease? *Infect. Urol.* 13, 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, 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., Cappuccio, A., Tannous, W., Wang, S.P., Kuo, C.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, September 11-14, p. 415 (1996).*

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

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).

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