

**Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac**

Deutsch/English/Français



**HERSTELLER/MANUFACTURER/FABRICANT**

**medac**

Gesellschaft für klinische  
Spezialpräparate mbH  
Fehlandtstraße 3  
D-20354 Hamburg

**VERTRIEB/MARKETING/DISTRIBUTION**

**medac**

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

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

Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 359

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

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

Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 113

Deutsch: S. 1

English: p. 14

Français: p. 26

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

## Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac

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

Katalog-Nr.: 430-TMB

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

### EINFÜHRUNG

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

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

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

*C. trachomatis* und *C. pneumoniae* sind ausschließlich humanpathogen.

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

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

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

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

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

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

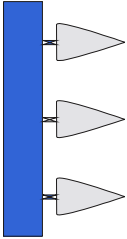
Aufgrund der Unzulänglichkeiten von kulturellen und nicht kulturellen Erreger-/Antigennachweisen zur Diagnose von ***C. pneumoniae***-Infektionen wird die Serologie als Methode der Wahl angesehen.

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

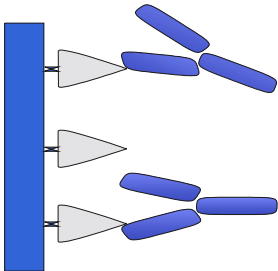
Der ***Chlamydia pneumoniae*-sELISA medac** arbeitet mit einem hochaufgereinigten und spezifischen Antigen. Der Nachweis von IgM-, IgA- und IgG-Antikörpern gegen ***C. pneumoniae*** erlaubt eine Abklärung des Infektionsstatus und des Therapieverlaufs.

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

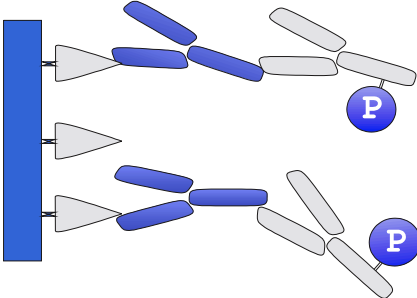
## TESTPRINZIP



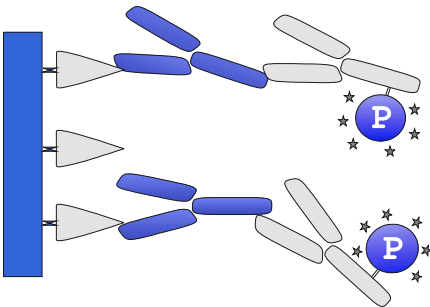
Mit *C. pneumoniae*-spezifischem Antigen beschichtete Mikrotiterplatte.



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



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



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

### Testvorteile

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

**PACKUNGSINHALT**

**KAT.-NR.: 430-TMB**

1. 

<b>MTP</b>
------------

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

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>
----------------	----------

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

<b>CONTROL</b>	<b>+</b>
----------------	----------

Positive Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4. 

<b>WB</b>
-----------

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

<b>BAC-DIL</b>
----------------

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

<b>CON</b>
------------

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. 

<b>TMB</b>
------------

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

<b>STOP</b>
-------------

Stopplösung: 2 Fläschchen à 11 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 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
Probenverdünnungspuffer	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 (H<sub>2</sub>O 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 (RT) 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, 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 me-dac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

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

## 4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

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

4.2. 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 in die Vertiefung A1 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettieren (s. 6.A.). Anschließend in Doppelbestimmung jeweils 50 µl negative Kontrolle, dann in Einfachbestimmung die positive Kontrolle (50 µl), sowie fortlaufend auch in Einfachbestimmung die verdünnten Patientenproben (50 µl) pipettieren.

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



5.3. 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 ( $\pm$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 + 0,380**
- \* **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: $\frac{\text{OD der Probe}}{\text{Cut-off}}$	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 IgM 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.
- \* Kreuzreaktionen mit antinukleären Antikörpern, heterophilen Antikörpern sowie *C. psittaci*- und *C. trachomatis*-Antikörpern sind in Einzelfällen nicht auszuschließen.

## 6.C. SPEZIFISCHE IgG-/IgA-INTERPRETATION

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 Patienten gemessen, die klinisch keinen Verdacht auf eine respiratorische Infektion zeigten. In der MIF waren keine Antikörper gegen *C. pneumoniae* nachweisbar.

Zur **Ermittlung der Sensitivität** wurden Seren von Patienten mit klinischem Verdacht auf eine respiratorische Infektion gemessen. In allen Seren waren in der MIF Antikörper gegen *C. pneumoniae* nachweisbar.

Probandengruppe	Spezifität	
	IgA	IgG
Patienten ohne respiratorische Infektion; keine Antikörper gegen <i>C. pneumoniae</i> in der MIF.	93% (n=86)	95% (n=42)

Probandengruppe	Sensitivität	
	IgA	IgG
Patienten mit respiratorischer Infektion; alle Seren mit Antikörper gegen <i>C. pneumoniae</i> in der MIF.	95% (n=74)	99% (n=117)

## 7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	Ø OD	S	VK (%)	n		Ø OD	S	VK (%)
NK	0,032	0,009	27	21	NK	0,035	0,004	11
GW	0,772	0,038	5	21	GW	0,824	0,073	9
PK	1,990	0,062	3	21	PK	2,133	0,149	7
Nr. 1	1,951	0,098	5	21	Nr. 3	1,655	0,140	8
Nr. 2	0,731	0,030	4	21	Nr. 4	1,027	0,087	8

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

### **ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE**

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

### **SICHERHEITSHINWEISE**

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

## **ENTSORGUNGSHINWEISE**

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

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

**Ausgabedatum: 01.10.2007**

**Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac**

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

Cat. no.: 430-TMB

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

**INTRODUCTION**

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

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

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

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

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



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

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

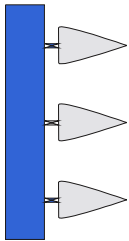
The shortcomings of culture and non-culture methods for the diagnosis of *C. pneumoniae* infections have made serology the method of choice.

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

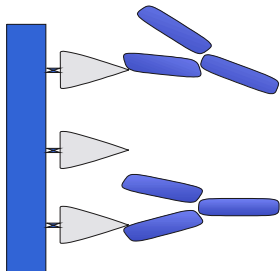
The **Chlamydia pneumoniae-SELISA medac** employs a highly purified and specific antigen. The detection of IgM, IgA, and IgG antibodies allows the appraisal of the infection's status and the follow up after treatment.

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

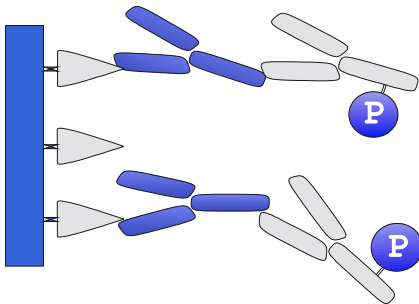
## TEST PRINCIPLE



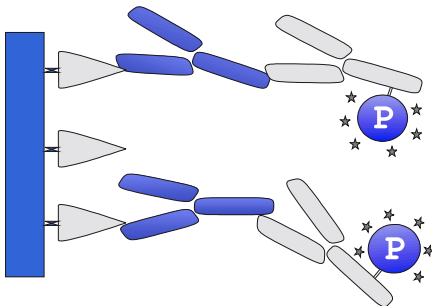
The plate is coated with a highly purified *C. pneumoniae*-specific antigen preparation.



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



Peroxidase-conjugated anti-human 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

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

## KIT CONTENTS

Cat. no.: 430-TMB

1. 

<b>MTP</b>
------------

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

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>
----------------	----------

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

<b>CONTROL</b>	<b>+</b>
----------------	----------

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

<b>WB</b>
-----------

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

<b>BAC-DIL</b>
----------------

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

<b>CON</b>
------------

Conjugate: 4 vials with 4.5 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready for use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
7. 

<b>TMB</b>
------------

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

<b>STOP</b>
-------------

Stop solution: 2 vials with 11 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ready for use.

## **1. STORAGE AND STABILITY**

<b>MATERIAL/REAGENT</b>	<b>STATE</b>	<b>STORAGE</b>	<b>STABILITY</b>
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 (H<sub>2</sub>O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of Wash Buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

## **3. PREPARATION OF THE REAGENTS**

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

Calculate the number of wells required.

### 3.1. Microplate

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

### 3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (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, 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, but not for plasma.

4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain 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 for use and do not have to be pre-washed.**

5.2. Pipette 50 µl of sample diluent into the well A1 as blank(see 6.A.), in duplicate each 50 µl of the negative control, and each 50 µl of the positive control and the diluted patients' samples for single determinations.

**If necessary the microplate wells can be kept in a humid chamber up to 30 min at RT before proceeding.**

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 each 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 instruments, 60 µl of conjugate have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the automates.**

**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 the microplate wells 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 the microplate wells 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 + 0.380**
- \* **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 IgM, and with the 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.
- \* Cross-reactivities with antinuclear antibodies, heterophilic antibodies and antibodies to *C. psittaci* as well as to *C. trachomatis* cannot be excluded in individual cases.



### 6.C. SPECIFIC IgG/IgA INTERPRETATION

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 patients without symptoms of respiratory infection were investigated for the **determination of specificity**.

By MIF no antibodies to *C. pneumoniae* were detectable.

Sera from patients suspected for respiratory infection were investigated for the **determination of sensitivity**.

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

Patient Group	Specificity	
	IgA	IgG
Patients without respiratory infections; no antibodies to <i>C. pneumoniae</i> by MIF.	93% (n=86)	95% (n=42)

Patient Group	Sensitivity	
	IgA	IgG
Patients with respiratory infections; all sera with antibodies to <i>C. pneumoniae</i> by MIF.	95% (n=74)	99% (n=117)

## **7.B. PRECISION**

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation (n = 11)		
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean OD	SD	CV (%)
NC	0.032	0.009	27	21	NC	0.035	0.004	11
BC	0.772	0.038	5	21	BC	0.824	0.073	9
PC	1.990	0.062	3	21	PC	2.133	0.149	7
N° 1	1.951	0.098	5	21	N° 3	1.655	0.140	8
N° 2	0.731	0.030	4	21	N° 4	1.027	0.087	8

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: 01.10.2007**

## **Chlamydia pneumoniae-IgG-sELISA medac**

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

Réf.: 430-TMB

DESTINEE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

### **INTRODUCTION**

Les Chlamydiae sont des bactéries pathogènes gram-négatives. Elles possèdent obligatoirement un cycle vital intracellulaire dans les couches superficielles des muqueuses, dans les cellules endothéliales, dans les cellules du muscle lisse et, d'après des récentes découvertes, dans certaines structures tissulaires du système nerveux central.

Les Chlamydiae dépendent des phosphates riches en énergie de leur cellules hôtes et sont par conséquent appelés des parasites énergétiques.

Le genre chlamydia comprend quatre espèces: *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci* et *C. pecorum*.

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

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

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

La prévalence des infections à *C. pneumoniae* a été estimée au moins à 10% chez les enfants pas encore scolarisés, suivie par une forte

augmentation jusqu'à 50% au-delà de 20 ans et jusqu'à 80 - 100% après 70 ans.

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

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

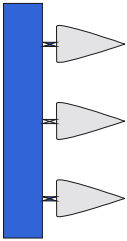
Les défauts des méthodes de culture et non culture, pour le diagnostic des infections à **C. pneumoniae** ont fait de la sérologie la méthode de choix.

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

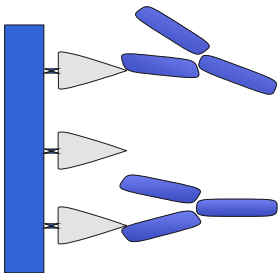
La méthode **Chlamydia pneumoniae-sELISA medac** utilise un antigène spécifique et hautement purifié. La détection des anticorps IgM, IgA, et IgG permet l'évaluation du stade de l'infection et le suivi après traitement.

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

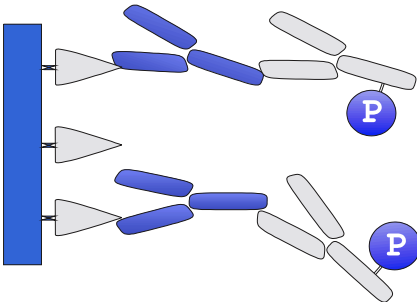
## PRINCIPE DU DOSAGE



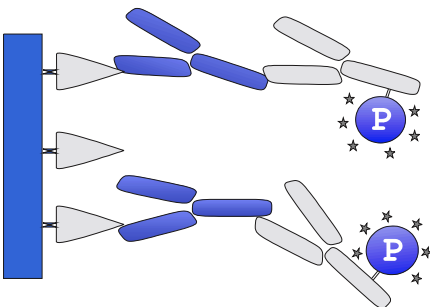
La plaque est revêtue avec une préparation antigénique spécifique fortement purifiée de *C. pneumoniae*.



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



Les anticorps anti-IgG humaines conjuguées 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

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

## CONTENU DE LA TROUSSE

Réf.: 430-TMB

1. 

<b>MTP</b>
------------

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

<b>CONTROL</b>	-
----------------	---

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. 

<b>CONTROL</b>	+
----------------	---

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. 

<b>WB</b>
-----------

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

<b>BAC-DIL</b>
----------------

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. 

<b>CON</b>
------------

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. 

<b>TMB</b>
------------

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

<b>STOP</b>
-------------

Solution d'arrêt: 2 flacons de 11 ml chacun, contenant de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,5 M, prête à l'emploi.

## **1. CONSERVATION ET STABILITE**

<b>Materiel/Reactifs</b>	<b>Etat</b>	<b>Conservation</b>	<b>Stabilite</b>
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 (TA).

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

**Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôle, conjugué) de différents lots. Par contre, le diluant pour échantillons, 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, mais pas avec des échantillons de plasma.

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

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

## **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 6.A.) et 50 µl de contrôle négatif (en doublets), de contrôle positif et d'échantillon de patient dilué dans les puits respectifs.

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

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

\*) procédure manuelle/automatique (voir 5.5.)

## 6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

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

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

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

- \* Des échantillons qui ont des valeurs de D.O. dans la zone grise doivent être dosés de nouveau avec des échantillons frais prélevés 14 jours après, afin de pouvoir déterminer un changement dans le titre d'anticorps.
- \* Les IgA et IgM et avec résultats devraient être toujours interprétés conjointement avec 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.
- \* Des réactions croisées avec des anticorps anti-nucléaires, avec des anticorps hétérophiles, ainsi qu'avec des anticorps anti-**C. psittaci** et anti-**C. trachomatis** ne peuvent pas être exclus dans certains cas individuels.

## 6.C. INTERPRÉTATION SPECIFIQUE IgG/IgA

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 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. PERFORMANCE DU DOSAGE

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

### 7.A. SPECIFICITE ET SENSIBILITE

Des sérums provenant de patients ne présentant pas de symptômes d'infection respiratoire ont été examinés pour déterminer la spécificité. Par MIF, on n'a pas détecté d'anticorps anti-*C. pneumoniae*.

Des sérums provenant de patients suspectés atteints d'infection respiratoire ont été examinés pour déterminer la sensibilité. Par MIF, des anticorps anti-*C. pneumoniae* étaient détectables dans tous les sérums.

Groupe patients	Spécificité	
	IgA	IgG
Patients ne présentant pas d'infections respiratoires; pas d'anticorps anti- <i>C. pneumoniae</i> par MIF.	93% (n=86)	95% (n=42)

Groupe patients	Sensibilité	
	IgA	IgG
Patients avec d'infections respiratoire; tous les sérums présentaient des anticorps anti- <i>C. pneumoniae</i> par MIF.	95% (n=74)	99% (n=117)

## **7.B. PRECISION**

Echantillon	Variation Intra-essai				Echantillon	Variation Interessais (n = 11)		
	D.O. moyenne	E.T.	CV (%)	n		D.O. moyenne	E.T.	CV (%)
NC	0,032	0,009	27	21	NC	0,035	0,004	11
BC	0,772	0,038	5	21	BC	0,824	0,073	9
PC	1,990	0,062	3	21	PC	2,133	0,149	7
N° 1	1,951	0,098	5	21	N° 3	1,655	0,140	8
N° 2	0,731	0,030	4	21	N° 4	1,027	0,087	8

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 desécurité 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.

**Date de mise à jour: 01.10.2007**

## LITERATUR/REFERENCES/LITTÉRATURE

Balin, B.J., Gérard, H.C., Arking, E.J., Appelt, D.M., Branigan, P.J., Abrams, J.T., Whittum-Hudson, J.A., Hudson, A.P.: Identification and localization of ***Chlamydia pneumoniae*** in the Alzheimer's brain. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 23-42 (1998).

Christiansen, G., Boesen, T., Hjerno, K., Daugaard, L., Mygind, P., Madsen, A.S., Knudsen, K., Falk, E., Birkelund, S.: Molecular biology of ***Chlamydia pneumoniae*** surface proteins and their role in immunopathogenicity. *Am. Heart J.* 138, S491-495 (1999).

Danesh, J., Collins., Peto, R.: Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 350, 430-436 (1997).

Elkind, M.S., Lin, I.F., Grayston, J.T., Sacco, R.L.: ***Chlamydia pneumoniae*** and the risk of first ischemic stroke. The Northern Manhattan stroke study. *Stroke* 31, 1521-1525 (2000).

Gérard, H.C., Schumacher, R.H., El-Gabalawy, H., Goldbach-Mankys, R., Hudson, A.P.: ***Chlamydia pneumoniae*** present in the human synovium are viable and metabolically active. *Microbiol. Pathol.* 29, 17-24 (2000).

Grayston, J.T.: Epidemiology of ***Chlamydia pneumoniae*** (TWAR). In: *Chlamydia Research*. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11.-14. September, 211-214 (1996).

Grayston, J.T., Aldous, M.B., Easton, A., Wang, S.P., Kuo C.C., Campbell, L.A., Altman, J.: Evidence that ***Chlamydia pneumoniae*** causes pneumonia and bronchitis. *J. Infect. Dis.* 168, 1231-1235 (1993).

Gupta, S., Leatham, E.W., Carrington, D., Mendall, M.A., Kaski, J.C., Camm, A.J.: Elevated ***Chlamydia pneumoniae*** antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 69, 401-407 (1997).

Gurfinkel, E., Bozovich, G., Caroca, A., Beck, E., Mautner, B.: Randomised trial of roxithromycin in nin-Q-wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. *Lancet* 350, 404-407 (1997).

Hahn, D.L., Peeling, R.W., Dillon, E., McDonald, R., Saikku, P.: Serologic Markers for ***C. pneumoniae*** in asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 84, 227-233 (2000).

Heinzl, S.: Chlamydien, Arteriosklerose, Asthma und MS. *Med. Monatsschr. Pharm.* 23, 37 (2000).

Hunter, S.F., Hafler, D.A.: Ubiquitous pathogens: links between infection and autoimmunity in MS? *Neurology* 55, 164-165 (2000).

Kuo, C.-C., Jackson, L.A., Campbell, L.A., Grayston, J.T.: ***Chlamydia pneumoniae***(TWAR). *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 451-461 (1995).



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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