

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# Chlamydia trachomatis IgM ELISA

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Chlamydia trachomatis in human serum or plasma



DE3811



96



**NovaTec Immundiagnostica GmbH**  
**Technologie & Waldpark**  
Waldstr. 23 A6  
D-63128 Dietzenbach  
Germany

**Distributed by / Vertrieb durch:**  
Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel-Wellsee  
Germany

## 1. INTRODUCTION

Chlamydiae are nonmotile, Gram negative and obligatory intracellular growing bacteria which form characteristic inclusions within the cytoplasm of parasitized cells. They are easily visible in the light microscope. Three different Chlamydia species pathogenic for humans are known: Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae and Chlamydia psittaci, and one species only pathogenic for animals (*C. pecorum*). Chlamydia trachomatis is the most prevalent agent of sexually transmitted diseases worldwide (400-500 million cases) and the number of infections is constantly growing, during childbirth, causing conjunctivitis or pneumonia in newborns. Untreated cases of chlamydial infection can lead to chronic salpingitis, possibly resulting in ectopic pregnancy or infertility. In males, *C. trachomatis* is a major cause of non-gonococcal urethritis.

A severe problem in Chlamydia infections is the frequent asymptomatic insidious course which may result in the initiation of chronic diseases. In many instances primary infections are not recognized and only the sequelae caused by ascended, persisting agents are diagnosed.

Species	Mechanism of infection	Disease	Diagnostics
<i>C. trachomatis</i>	Direct or sexual transmission: The primary site of infection usually is the mucous membrane of the eye or the urogenital tract	Lymphogranuloma venereum (LGV) Trachoma Inclusion conjunctivitis of neonates and adults; Cervicitis, salpingitis, urethritis, epididymitis, proctitis and pneumonia of newborns	Serology  PCR  Microscopy
<i>C. pneumoniae</i>	Infiltration of the mucous membrane of the respiratory tract	Respiratory diseases discussed: endocarditis, coronary heart diseases	
<i>C. psittaci</i>	Inhalation of feces from infected birds; contact with infected avian viscera	Ornithosis (Psittacosis)	

Infection may be identified by

- Microscopy: Giemsa stain
- PCR
- Serology: Detection of antigens by ELISA  
Detection of antibodies by IF, EIA, ELISA

## 2. INTENDED USE

The Chlamydia trachomatis IgM-ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Chlamydia trachomatis in human serum or plasma (citrate).

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies against Chlamydia trachomatis is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with Chlamydia trachomatis antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgM conjugate is added. This conjugate binds to the captured Chlamydia-specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of Chlamydia specific IgM antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

## 4. MATERIALS

### 4.1. Reagents supplied

- **Chlamydia trachomatis Coated Wells (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Chlamydia trachomatis antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent \*\*\*:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml acidic solution, 0.4 N; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **Chlamydia trachomatis anti-IgM Conjugate\*\*:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgM; coloured red, ready to use; black cap.

- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Chlamydia trachomatis IgM Positive Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Chlamydia trachomatis IgM Cut-off Control\*\*\*:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Chlamydia trachomatis IgM Negative Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

\* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

\*\* contains 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contains 0.1 % Kathon

## 4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

## 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

## 6. REAGENT PREPARATION

---

*It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!*

### 6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Chlamydia trachomatis antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

### 6.2. Chlamydia trachomatis anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20ml of a solution with anti-human-IgM horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.4. IgM Sample Diluent

The bottle contains 100ml phosphate buffer, anti human-IgG, stabilizers, preservatives and an inert green dye. It is used for the dilution of the patient specimen. The solution contains antihuman IgG class antibodies to eliminate competitive inhibition from specific IgG class antibody to remove rheumatoid factor. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

### 6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.7. Stop Solution

The bottle contains 15ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date.*

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70 to -20°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

### 7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

*It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate.*

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour  $\pm$  5 min at  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be  $>5\text{sec}$ . At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!  
*Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.*
5. Dispense 100µl Chlamydia trachomatis anti-IgM Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.  
*Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*

*Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in U by 2.*

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

### 8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader to **zero** using the **substrate blank in well A1**.

*If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!*

**Measure the absorbance** of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

*Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.*

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

## 9. RESULTS

---

### 9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

### 9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

*Example: Absorbance value Cut-off control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43*

$$\text{Cut-off} = 0.43$$

### 9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

#### 9.3.1. Results in Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{U}]$$

*Example:  $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 \text{ U (Units)}$*

Cut-off:	10	U
Grey zone:	9-11	U
Negative:	<9	U
Positive:	>11	U

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

### 10.1. Precision

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean (U)</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos Serum	12	78.5	12.1
<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean (OD)</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos. Serum	24	1.29	3.1

### 10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is >95 %.

### 10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 83.3 %.

### 10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

<b>Note:</b> The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.
--

## 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

The Chlamydia trachomatis antigen which is coated on the plates is comprised of elementary bodies. A cross reaction with Chlamydia pneumoniae cannot be excluded with sera containing antibodies to LPS and MOMP.

## 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
----------	---

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
----------	--

### 12.1. 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.

## 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.: DE3811 Chlamydia trachomatis IgM-ELISA (96 Determinations)

## 1. EINLEITUNG

Chlamydien sind unbewegliche, gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterien. Sie unterscheiden sich von allen anderen Bakterien durch ihre Kleinheit (kleinste Einheit ca. 0,2µm), einen speziellen Vermehrungszyklus und die Existenz von zwei verschiedenen zellmorphologischen Erscheinungsformen, den Elementar- und den Initialkörperchen. Die sehr kleinen Elementarkörperchen garantieren das Überleben außerhalb der Zelle und sind als infektiöse Form dieser Bakterien anzusehen. Eine Vermehrung ist erst möglich, wenn das Elementarkörperchen von der Wirtszelle phagozytiert wird, wo es sich dann innerhalb eines Phagosoms befindet.

Dort wird es größer und beginnt sich als Initialkörperchen zu teilen. Die Phagosomvakuole füllt sich und dominiert als so genanntes Einschlusskörperchen. 2-3 Tage nach der Infektion der Wirtszelle geht diese zugrunde und setzt dabei die Elementarkörperchen frei, die erneut Zellen befallen. Man unterscheidet drei für den Menschen pathogene Spezies:

- Chlamydia trachomatis
- Chlamydia pneumoniae
- Chlamydia psittaci

C. trachomatis wird in zwei Biovare unterteilt, nämlich „trachoma“ (tr) und „lymphogranuloma venereum“ (lv). Bei den humanpathogenen Biovaren trachoma und lymphogranuloma venereum werden mehrere Serovare unterschieden, die bei den einzelnen Infektionskrankheiten mit unterschiedlicher Häufigkeit gefunden werden. Chlamydia trachomatis ist die häufigste Ursache sexuell übertragener Erkrankungen weltweit (400-500 Millionen Fälle). Schwangere Frauen mit C. trachomatis können unter der Geburt das Neugeborene infizieren. Es kommt zu Konjunktividen oder Pneumonien. Unbehandelte Fälle von Chlamydien Infektionen können zu chronischer Salpingitis mit resultierenden ektope Schwangerschaften oder Sterilität führen. Bei Männern ist Chlamydia trachomatis häufigste Ursache der nicht gonorrhoischen Urethritiden. Ein ernstes Problem der Chlamydien Infektionen ist der häufig asymptomatische Verlauf, der letztlich jedoch in einer chronischen Erkrankung resultieren kann. In vielen Fällen wird die Primärinfektion nicht rechtzeitig erkannt und erst die Folgeschäden diagnostiziert.

Spezies	Übertragungsweg	Symptome (Biovar, Serovar)	Komplikationen	Diagnostik
C. trachomatis	Kontrakt- Schmierinfektion  (Geschlechtsverkehr)	Trachom (tr.; A-C) Einschlußkonjunktivitis (tr.; D-K) Urogenitalinfektionen (tr.; D-K) Lymphogranuloma venereum (lv.; L1-3) Wie C. psittaci	Salpingitis Perihepatitis Arthritis, Urethritis, Adnexitis, Zervizitis, Proktitis, Pneumonie Erblindung	Serologie  Mikroskopie
C. pneumoniae	Aerogen, Tröpfcheninfektion	Mögl. Endokarditis, koronare Herzkrankheiten	Wie C. psittaci	
C. psittaci	Aerogen	Bronchitis, Pneumoniae	Sepsis, Meningitis, Endokarditis	

Infektionen können nachgewiesen werden mittels:

- Mikroskopie: Giemsa-Färbung
- PCR
- Serologie: Nachweis der Antigene mittels ELISA  
Nachweis der Antikörper mittels IF, EIA, ELISA

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der Chlamydia trachomatis IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Chlamydia trachomatis in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

## 3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen Chlamydia trachomatis beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Chlamydia trachomatis spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-human-IgM Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450nm gemessen werden kann.

## 4. MATERIALIEN

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Chlamydia trachomatis beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Chlamydia trachomatis Antigen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer\*\*\*:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; enthält anti-human-IgG-Antikörper; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Säure, 0.4 N, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Chlamydia trachomatis anti-IgM-Konjugat\*\*:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Chlamydia trachomatis IgM Positivkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Chlamydia trachomatis IgM Cut-off Kontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

- **Chlamydia trachomatis IgM Negativkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

\* enthält 0.1% Bronidox L nach Verdünnung

\*\* enthält 0.2% Bronidox L

\*\*\* enthält 0.1% Kathon

## 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

## 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

## 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

*Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!*

### 6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Chlamydia trachomatis Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

### 6.2. Chlamydia trachomatis anti-IgM-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgM-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten 2 bzw. 3 ml gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1% Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.4. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten grünen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung enthält anti-human-IgG-Antikörper, um den Proben spezifische IgG-Anteile sowie IgG-gebundene Rheumafaktoren zu entziehen. Sie wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt und ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

### 6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!* Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

### 7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).



## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

### 8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschritte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank).
1 Vertiefung	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen.

*Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.*

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

*Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

5. 100µl Chlamydia trachomatis anti-IgM-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*

*Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgM-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in U wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*

11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

### 8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

*Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!*

**Extinktion** aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

*Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.*

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

---

### 9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200** und < **cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

### 9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

*Beispiel: 0.44 OD Cut-off Kontrolle + 0.42 OD Cut-off Kontrolle = 0.86 : 2 = 0.43*

*Cut-off = 0.43*

### 9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**  
Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

#### 9.3.1. Ergebnisse in Einheiten [U]

$$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{Einheiten} = U]$$

Beispiel:  $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 U (\text{Units})$

Cut-Off: 10 U  
Grauzone: 9-11 U  
Negativ: <9 U  
Positiv: >11 U

## 10. TESTMERKMALE

### 10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert (U)	Vk (%)
Pos Serum	12	78.5	12.1
Intraassay	n	Mittelwert (OD)	Vk (%)
Pos. Serum	24	1.29	3.1

### 10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >95 %.

### 10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 83,3 %.

### 10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

Das auf die Mikrotiterplatte beschichtete Antigen besteht aus den Elementarkörperchen. Eine Kreuzreaktion mit Chlamydia pneumoniae kann nicht ausgeschlossen werden mit Seren, die Antikörper gegen LPS- und MOMP- Partikeln enthalten.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf **Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv** getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat **sorgfältig** in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

**WARNUNG:** Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

**WARNUNG:** Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

### **12.1. Entsorgungshinweise**

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

### **13. BESTELLINFORMATIONEN**

---

Produktnummer: DE3811 Chlamydia trachomatis IgM-ELISA (96 Bestimmungen)

## 1. INTRODUCTION

Chlamydiae sont des bactéries à développement intracellulaire, immobiles et Gram-négatives, qui forment des inclusions caractéristiques dans le cytoplasme des cellules parasitées. Elles sont facilement visibles dans le photo-microscope. Trois espèces différentes de Chlamydia pathogènes pour les humains sont connues : Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae et Chlamydia psittaci, ainsi qu'une espèce pathogène seulement pour des animaux (C. pecorum). Chlamydia trachomatis est l'agent le plus répandu des maladies transmises sexuellement dans le monde entier (400-500 millions de cas) et le nombre d'infections augmente constamment. Pendant l'accouchement, Chlamydia trachomatis entraîne la conjonctivite ou la pneumonie dans les nouveaux-nés. Les cas non traités de l'infection par Chlamydia peuvent mener aux salpingites chroniques, qui peuvent résulter en grossesse ectopique ou l'infertilité. Dans les mâles, Chlamydia trachomatis est une cause importante de l'urétrite non-gonococcique.

Un problème grave dans les infections de Chlamydia est le cours de la maladie, fréquemment insidieux et asymptomatique, qui peut avoir comme conséquence le déclenchement des maladies chroniques. Dans beaucoup de cas, des infections primaires ne sont pas identifiées et seulement les conséquences provoquées par des agents augmentés et persistants sont diagnostiquées.

Espèce	Mécanisme de l'infection	La maladie	Diagnostic
C. trachomatis	Transmission directe ou sexuelle : D'habitude, l'emplacement primaire de l'infection est la membrane muqueuse de l'œil ou de la région urogénitale	Lymphogranuloma venereum (LGV) Trachome Conjonctivite des nouveau-nés et des adultes ; Cervicites, salpingites, urétrite, epididymitis, proctites et pneumonie des nouveaux-nés	Sérologie PCR Microscopie
C. pneumoniae	Infiltration de la membrane muqueuse de la région respiratoire	maladies respiratoires discuté : endocardite, maladies coronaires	
C. psittaci	Inhalation des résidus des oiseaux infectés ; contact avec les viscères aviens infectés	Ornithose (Psittacose)	

L'infection peut être identifiée par

- Microscopie : Colorant de Giemsa
- PCR
- Sérologie : Détection des antigènes par ELISA  
Détection des anticorps par IF, EIA, ELISA

## 2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Chlamydia trachomatis IgM ELISA est prévue pour la détermination qualitative des anticorps IgM anti-Chlamydia trachomatis dans le sérum humain ou plasma (citrate).

## 3. PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgM anti-Chlamydia trachomatis est basée sur la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes d'Chlamydia trachomatis pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, le conjugué anti-IgM humaines marquées à la peroxydase du raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés spécifiques de l'Chlamydia trachomatis. Le complexe immun constitué par le conjugué lié est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM spécifiques de Chlamydia trachomatis dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

## 4. MATERIEL

### 4.1. Réactifs fournis

- **Puits revêtus d'Chlamydia trachomatis (IgM)** : 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène d'Chlamydia trachomatis; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgM \*\*\*** : 1 bouteille contient 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré vert; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution d'arrêt** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide solution, 0.4 N ; prêt à l'emploi ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (concentrée x 20.) \*** : 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon concentré 20 fois (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; bouchon blanc.
- **Conjugué IgM anti-Chlamydia trachomatis \*\*** : 1 flacon contenant 20 ml d'anticorps de lapin anti-IgM humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort ; prêt à l'emploi ; couleur rouge, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi ; bouchon jaune.
- **Contrôle positif IgM Chlamydia trachomatis \*\*\*** : 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon rouge.
- **Contrôle seuil (cut-off) IgM Chlamydia trachomatis\*\*\*** : 1 flacon contenant 3 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon vert.
- **Contrôle négatif IgM Chlamydia trachomatis \*\*\*** : 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon bleu.

\* contient 0,1 % de Bronidox L après dilution

\*\* contient 0,2 % de Bronidox L

\*\*\* contient 0,1 % de Kathon

## 4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

## 4.3. Matériel et équipement requis

- lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur à 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (récemment) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

## 5. STABILITE ET CONSERVATION

---

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'ils sont conservés entre 2 et 8°C.

## 6. PREPARATION DES REACTIFS

---

*Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (20 - 25°C) avant de commencer le dosage !*

### 6.1. Barrettes revêtues sécables

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de *Chlamydia trachomatis* et sont prêtes à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à +2...+8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

### 6.2. Conjugué IgM anti-*Chlamydia trachomatis*

Le flacon contient 20 ml d'une solution d'anti-IgM humaines avec de la peroxydase du raifort, un tampon, des stabilisants, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La solution est prête à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

### 6.3. Contrôles

Les flacons de contrôle positif, contrôle seuil (cut-off) et de contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prête à l'emploi. Elle contient 0,1% de Kathon et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

### 6.4. Diluant pour échantillon IgM

Le bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, d'IgG anti-humain, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant vert inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. La solution contient des anticorps IgG anti-humains pour éliminer l'inhibition compétitive des anticorps IgG spécifiques pour ainsi enlever le facteur rhumatoïde. Cette solution prête à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

### 6.5. Solution de lavage (conc. x 20)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20<sup>ème</sup> ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. Le tampon dilué est stable 5 jours si conservé à température ambiante. Le tampon concentrée est stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C. *Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

### 6.6. Solution de substrat TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2...+8°C, à l'abri de la lumière. *La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

### 6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0,2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2-8°C.*

## 7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

---

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma (citrate) humain pour cette analyse. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à +2...+8°C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.*  
L' inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

### 7.1. Dilution de l'échantillon

Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués au 1/101<sup>ème</sup> avec le diluant pour échantillon IgM.  
Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml du diluant pour échantillon IgM dans des tubes pour obtenir une dilution au 1/101<sup>ème</sup> et mélanger soigneusement sur un Vortex.

## 8. PROCEDE DE DOSAGE

### 8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

*Il est conseillé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets si nécessaire.*

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipeter 100 µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape !  
*Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.*
5. Pipeter 100µl du conjugué IgM anti-Chlamydia trachomatis dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.** *Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.*
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**
10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB.  
*La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.*  
*Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec du sérum physiologique, par exemple au 1/2. Ensuite diluer l'échantillon au 1/101<sup>ème</sup> avec le tampon et multiplier les résultats en U (units) par 2.*
11. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

### 8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc substrat dans le puits A1.

*Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !*

**Mesurer l'absorbance** de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

*Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.*

Calculer les **valeurs moyennes d'absorbance** pour tous les doublets, si nécessaire.

## 9. RESULTATS

### 9.1. Critères de validation

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0,200** et < **cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1: Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance > **contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

### 9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple : 0,37 DO cont. seuil + 0,39 DO cont. seuil = 0,76 ÷ 2 = 0,38

« Cut-off » = 0,38

### 9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorbance est supérieure de 10% à la valeur seuil.

Des échantillons avec une valeur d'absorbance comprise entre +10% et -10% autour de la valeur « seuil » ne peuvent pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est conseillé de refaire le dosage 2 à 4 semaines après, avec un échantillon frais. Si les résultats du deuxième dosage sont encore dans la zone grise, l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorbance est inférieure de 10% à la valeur « seuil ».

### 9.3.1. Résultats en unités

Valeur (moyenne) d'absorbance du patient x 10 = [ unités = U ]

« seuil »

Exemple :  $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U}$

« Seuil » :	10	U
Zone grise :	9-11	U
Négatif :	< 9	U
Positif :	> 11	U

## 10. PERFORMANCES DU DOSAGE

### 10.1. Précision

<u>Inter-essais</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum pos.	12	78.5	12.1
<u>Intra-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum pos.	24	1.29	3.1

### 10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à > 95.5 %.

### 10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 83.3 %.

### 10.4. Interférences

Des sérums hémolytiques ou lipémiques ou icteriques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/ml de hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0,2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

## 11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

L'interaction avec *Chlamydia pneumoniae* ne peut pas être exclue et peut donner de faux résultats.

## 12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éblouir.
- Le ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : A la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique en cas de contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

### 12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

## 13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence : DE3811 Chlamydia trachomatis IgM-ELISA (96 déterminations)

## 1. INTRODUZIONE

Le Chlamydie sono batteri immobili Gram negativi e parassiti intracellulari obbligati. Gli involucri esterni risultano privi della componente peptidoglicanica della parete cellulare. Hanno un ciclo vitale dimorfico: il corpo elementare è la forma infettante e molto piccola. È relativamente inerte dal punto di vista metabolico e sopravvive in ambiente extracellulare. Il corpo elementare viene introdotto in una cellula delle mucose per endocitosi, dove si trasforma in un corpo reticolare, che presenta una chiara organizzazione cellulare procariotica, è metabolicamente attivo e si moltiplica, per scissione binaria. Dopo poche ore questo subisce un processo di condensazione e disidratazione, ritrasformandosi in un corpo elementare che, liberato all'esterno per la morte della cellula parassitata, è pronto ad infettare altre cellule. Si distinguono tre specie patogene per l'uomo:

- Chlamydia trachomatis
- Chlamydia pneumoniae
- Chlamydia psittaci

La Chlamydia trachomatis può causare una malattia sessualmente trasmissibile. L'infezione da Clamidia è molto comune tra gli adulti giovani e tra gli adolescenti. Tuttavia molte persone non sanno di essere infette, poiché non hanno nessun sintomo. È la causa più frequente per malattie a trasmissione sessuale (400-500 milioni di casi in tutto il mondo). La Clamidia può essere trasmessa da madre a bambino durante la nascita. L'infezione da Clamidia nei neonati può causare una congiuntivite neonatale e polmonite. Donne infette possono trasmettere c. trachomatis al neonato durante il parto. Nelle donne, una infezione non curata può diffondersi nella zona pelvica e infettare l'utero, le tube di falloppio e le ovaie, portando alla malattia infiammatoria pelvica. Essa può causare danni permanenti agli organi riproduttivi della donna, può portare alla sterilità, dolore pelvico cronico e un rischio maggiore di gravidanza extrauterina. Negli uomini, una Clamidia non curata può avere un effetto deleterio sui testicoli, portando a gonfiori e dolore. Complicazioni collegate possono portare alla sterilità.

Specie	Malattia	Complicanze	Modo d'infezione
C. trachomatis	Trachoma; Congiuntivite; infezioni del tratto urogenitale	Salpingite; Perihepatite; Artrite; Uretrite	Trasmissione: aerea; contatto diretto con una persona infetta (sessuale)
C. pneumoniae	Bronchite; Polmonite,	Sepsi, Meningite, Endocardite	Trasmissione: aerea; contatto diretto con una persona infetta (sessuale)
C. psittaci	Bronchite; Polmonite	Sepsi, Meningite, Endocardite	Trasmissione: aerea; contatto diretto con una persona infetta (sessuale)

### Diagnosi

- Microscopia: coltura cellulare, colorazione di Giemsa, immunofluorescenza indiretta IFA
- PCR
- Sierologia: ELISA

## 2. USO PREVISTO

Il Chlamydia trachomatis IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per Chlamydia trachomatis nel siero o plasma (citrato) umano.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per Chlamydia trachomatis si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici della Chlamydia trachomatis. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgM umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per la Chlamydia trachomatis di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

## 4. MATERIALI

### 4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni della Chlamydia trachomatis (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della Chlamydia trachomatis; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgM\*\*\*:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color verde; pronto all'uso; tappo bianco; contiene anticorpi anti IgG umani.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido Soluzione, 0.4 N, pronto all'uso; tappo rosso.



- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH  $7.2 \pm 0.2$ ; tappo bianco.
- **Coniugato Chlamydia trachomatis anti IgM\*\*:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgM umani, coniugati a perossidasi; color rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Chlamydia trachomatis IgM Controllo positivo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Chlamydia trachomatis IgM Controllo Cut-off\*\*\*:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Chlamydia trachomatis IgM Controllo negativo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

\* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

\*\* contiene 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contiene 0.1 % Kathon

## 4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

## 4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

## 5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

---

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

## 6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

---

*Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!*

### 6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati della Chlamydia trachomatis. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.2. Coniugato Chlamydia trachomatis IgM

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgM umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte rosso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.4. Tampone diluente IgM

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante verde inerte. La soluzione contiene anticorpi anti IgG umani per togliere dai campioni gli anticorpi specifici della classe IgG ed i fattori reumatici legati ad anticorpi IgG. Viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

## 6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

## 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

Usare campioni di siero o plasma (citrato) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

### 7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

## 8. PROCEDIMENTO

---

### 8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

*È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.*

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

*Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.*

5. Pipettare 100µl di Coniugato Chlamydia trachomatis anti-IgM in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$ ... $25^{\circ}\text{C}$ ).** *Non esporre a fonti di luce diretta.*
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$ ... $25^{\circ}\text{C}$ ) al buio.**
10. Pipettare 100µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*  
*Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgM. Il risultato U viene moltiplicato per due.*
11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

## 8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a zero usando il substrato-bianco (blank) in A1. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450 nm e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare la media delle assorbanze.

## 9. RISULTATI

---

### 9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < 0.100
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < 0.200 e < cut-off
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza 0.150 – 1.30
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza > Cut-Off

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

### 9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off è la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.44 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.42 = 0.86/2 = 0.43

$$\text{Cut-Off} = \underline{0.43}$$

### 9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**  
In questo caso è raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato è ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

#### 9.3.1. Risultati in unità [U]

$$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unità} = U]$$

Esempio:  $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 U \text{ (Units)}$

Cut-Off :	10	U
Dubbio:	9-11	U
Negativo:	<9	U
Positivo:	>11	U

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

---

### 10.1. Precisione

<b>Intradosaggio</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>Cv (%)</b>
Siero pos.	12	78.5	12.1

<b>Intradosaggio</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>
Siero pos.	24	1.29	3.1

### 10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a >95%.

### 10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è 83,3%.

### 10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

## 11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

## 12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

**ATTENZIONE:** Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

**ATTENZIONE:** L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

### 12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

## 13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: DE3811 Chlamydia trachomatis IgM-ELISA (96 determinazioni)

## 1. INTRODUCCIÓN

Las Chlamydias son bacterias inmóviles, gram-negativas, de hábitat intracelular. En comparación con otras bacterias son muy pequeñas (la unidad mas pequeña es de 0,2 µm), tienen un ciclo de reproducción especial y se manifiestan en dos formas morfológicas diferentes, las partículas elementales e las partículas iniciales. Las infimas partículas elementales garantizan la supervivencia fuera de una célula y representan la forma contagiosa. La reproducción es posible solamente cuando las partículas elementales están fagocitadas de la célula huésped donde comienzan a dividirse como partículas iniciales dentro del fagosoma. La célula huésped muere dos o tres días después de la infección y libera partículas elementales que de nuevo infectan a otras células. Se distinguen tres especies patógenos para el hombre: Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae y Chlamydia psittaci.

La C. trachomatis es la causa más frecuente de enfermedades de transmisión sexual en el mundo (400 a 500 millones casos). Pueden resultar neumonías o conjuntivitis en neonatos por la transmisión de la bacteria de la madre al niño durante el nacimiento. Los casos que no reciben tratamiento pueden conducir a una salpingitis crónica con embarazos ectópicos o infertilidad. En el hombre la C. trachomatis es la causa más frecuente de la infección uretral no gonorréica. A menudo el curso asintomático resulta un problema serio ya que puede derivar en una enfermedad crónica. En muchos casos sólo la secuela de la infección primaria es detectada.

Especies	Vía de transmisión	Enfermedad	Diagnóstico
Chlamydia trachomatis	gotas de fluido contaminado  (relaciones sexuales)	Lymphogranuloma venereum, trachoma, conjuntivitis en neonatos y adultos; cervicitis, salpingitis, uretritis, epididymitis, proctitis y neumonía en neonatos	Serología  PCR  Microscopia
Chlamydia pneumoniae	Aerogeno, gotas de fluido contaminado	Posiblemente endocarditis, enfermedad coronaria, bronquitis, neumonía, sepsis, meningitis	
Chlamydia psittaci	Inhalación de fecales de aves contaminados, contacto con vísceras infectadas de aves	Bronquitis, neumonía, sepsis, meningitis	

La bacteria puede ser detectada por:

- Microscopia: con coloración de Giemsa
- Cultura por cultivo
- Serología: Detección de antígenos a través de ELISA  
Detección de anticuerpos a través de IF, EIA, ELISA

## 2. USO PREVISTO

El enzimoimmunoensayo se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Chlamydia trachomatis en suero o plasma (citrato) humano.

## 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra Chlamydia trachomatis se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de Chlamydia trachomatis. Los anticuerpos existentes en la muestra se unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgM anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgM) recubiertas de antígeno de Chlamydia trachomatis:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Chlamydia trachomatis, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente de muestra IgM :** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; contiene IgG anti-humana; pH 7.2 ± 0.2; color verde; listo para el uso; tapón blanco.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido Solución, 0.4 N, listo para el uso; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.):\*** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado IgM anti-humano (Chlamydia trachomatis)\*\*:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa; color rojo; tapa negra; listo para el uso.

- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para el uso; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgM (Chlamydia trachomatis)\*\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para el uso.
- **Control cut-off de IgM (Chlamydia trachomatis)\*\*\*:** 1 botella de 3ml; color amarillo; tapa verde; listo para el uso.
- **Control negativo de IgM (Chlamydia trachomatis)\*\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para el uso.

\* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir

\*\* contiene 0.2% Bronidox L

\*\*\* contiene 0.1% Catón

## 4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

## 4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

## 5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

---

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

## 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

---

*Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!*

### 6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de Chlamydia trachomatis están selladas al vacío. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

### 6.2. Conjugado de IgM anti-humano (Chlamydia trachomatis)

La botella contiene 20ml de una solución de IgM anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante rojo inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

### 6.3. Controles

Las botellas de los controles contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

### 6.4. Diluyente de muestra IgM

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante verde inerte.. se utiliza para la dilución de la muestra del paciente. La solución contiene anticuerpos del tipo IgG anti-humanos para eliminar la inhibición competitiva de los anticuerpos de la clase IgG específicos y para retirar el factor reumatoide. Esta solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado entre 2...8°C.*

### 6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

### 6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzindina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

## 6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.

## 7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

---

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

### 7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 8. PROCEDIMIENTO

---

### 8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(z.B. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(z.B. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(z.B. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(z.B. D1)	para el control positivo

*Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.*

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

1. Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h  $\pm$  5 min a 37°C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla **tres veces** con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

***Nota:** El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!*

5. Pipetear 100µl de conjugado anti-IgM (Chlamydia trachomatis) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetear 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C).**
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

***Nota:** Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgM 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.*

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

## 8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

## 9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

---

### 9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción < **0.200** y < **cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción > **cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

### 9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

$$\text{Cut-off} = \underline{0,43}$$

### 9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción  $\pm 10\%$  del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

#### 9.3.1. Resultados en unidades [U]

$\frac{\text{Promedio de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unidades} = \text{U}]$

Ejemplo:  $\frac{1,204 \times 10}{0,43} = 28 \text{ U (Units)}$

Cut-Off:	10	U
Zona intermedia:	9-11	U
Negativo:	<9	U
Positivo:	>11	U

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

---

### 10.1. Precisión

<b>Inter ensayo</b>	<b>n</b>	<b>Promedio (U)</b>	<b>CV (%)</b>
Suero pos.	12	78.5	12.1

<b>Intra ensayo</b>	<b>n</b>	<b>Promedio (OD)</b>	<b>CV (%)</b>
Suero pos.	24	1.29	3.1

### 10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente (> 95 %).

### 10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico (83.3 %).



## 10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

*Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.*

## 11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

*El antígeno de Chlamydia trachomatis que reviste la placa está compuesto de cuerpos elementales. Una reacción cruzada con Chlamydia pneumoniae no puede excluirse con sueros que contengan anticuerpos contra LPS y MOMP.*

## 12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

**ADVERTENCIA:** Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

**ADVERTENCIA:** El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

### 12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

## 13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

Nº del producto: DE3811 Chlamydia trachomatis IgM-ELISA (96 determinaciones)

## **BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA**

---











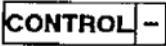







Hoyme U.B., Spitzbart H. (1996). Past and current prevalence of Chlamydia trachomatis in women in Germany. In: Chlamydia Research. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the third meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11.-14. Sept. p. 391.

Paavonen J. (1996). 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, Vol. 24, pp. 110-122.

Petersen E.E., Clad A. (1995). Genitale Chlamydieninfektionen. Deutsches Ärzteblatt 92, Heft 5, A-277-282.

Weström L. (1996). Consequences of genital Chlamydia infections in women. In: Chlamydia Research. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the third meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11.-14. Sept. pp. 137-140.

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

<b>Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos</b>	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo
	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
	Sample diluent buffer IgM/ IgM-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgM/ soluzione tampone per i campioni IgM/ solución tampón para muestras IgM
	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB
	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

# SCHEME OF THE ASSAY

Chlamydia trachomatis IgM-ELISA

## Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.  
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37°C</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 30 min at room temperature</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark</b>					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					