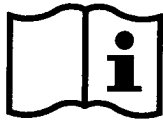


# Product information

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



## User's Manual

# Chlamydia pneumoniae IgM ELISA

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



**DE3913**



**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 non-motile, 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. Pregnant women infected with *C. trachomatis* may transmit these bacteria 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 Demeditec Chlamydia pneumoniae IgM-ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Chlamydia pneumoniae in human serum or plasma (citrate).

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

Microtiter strip wells are precoated with Chlamydia pneumoniae 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 pneumoniae-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 pneumoniae-specific IgM antibodies in the specimen. Acidic solution 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 pneumoniae Coated Wells (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Chlamydia pneumoniae antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent** \*\*\*: 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; containing anti-human-IgG; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml. Ready to use acidic solution, 0.4 N/l; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle each containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **Chlamydia pneumoniae 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 pneumoniae IgM Positive Control**\*\*\*: 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Chlamydia pneumoniae IgM Cut-off Control**\*\*\*: 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Chlamydia pneumoniae 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 450/620 nm
- 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 pneumoniae 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 pneumoniae anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20 ml 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 100 ml 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 50 ml 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 15 ml 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 15 ml 0.4 N acidic 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) 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 10 µl sample and 1 ml 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 left to the user to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.*

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° ± 1 °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 ± 5 min at 37±1 °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 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 pneumoniae 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 DU by 2.*

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm 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. Assay 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 Demeditec Units

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

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

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

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

Interassay	n	Mean (DU)	Cv (%)
Pos. Serum	12	21.6	8.25
Intraassay	n	Mean (E)	Cv (%)
Pos. Serum	24	1.16	4.01

### 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.

**Note:** 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 immunosuppressed patients and newborns serological data only have restricted value.

The Chlamydia pneumoniae antigen which is coated on the plates is comprised of elementary bodies. A cross reaction with Chlamydia trachomatis 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:** Acidic solution 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.

## 1. EINLEITUNG

Chlamydien sind unbewegliche, gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterien, die charakteristische Einschlüsse im Cytoplasma der parasitierten Zelle bilden. Im Lichtmikroskop sind sie gut zu erkennen. Man unterscheidet drei für den Menschen pathogene Spezies: Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae und Chlamydia psittaci. Chlamydia pecorum ist die einzige für Tiere pathogene Art. 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 Chlamydieninfektionen können zu chronischer Salpingitis mit resultierenden ektopen Schwangerschaften oder Sterilität führen. Bei Männern ist Chlamydia trachomatis häufigste Ursache der nicht gonorrhoischen Urethritiden. Ein ernstes Problem der Chlamydieninfektionen 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	Krankheit	Diagnostik
C. trachomatis	Direkte oder sexuelle Übertragung: Der primäre Infektionsort ist gewöhnlich die Schleimhaut des Auges oder des Urogenitaltraktes	Lymphogranuloma venereum (LGV) Trachoma Einschlußkonjunktivitis bei Neugeborenen und Erwachsenen, Cervicitis, Salpingitis, Urethritis, Epididymitis, Proctitis und Pneumonia von Neugeborenen	Serologie  PCR
C. pneumoniae	Infektion der Schleimhaut der Atemwege	Atemwegserkrankungen Diskutiert werden: Endocarditis, Koronare Herzerkrankungen	Mikroskopie
C. psittaci	Inhalation von Faeces infizierter Vögel; Kontakt mit infizierten Eingeweiden von Vögeln	Ornithosis (Psittacosis)	

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

## 3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen Chlamydia pneumoniae beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Chlamydia pneumoniae 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 saurer Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.



## 4. MATERIALIEN

---

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Chlamydia pneumoniae beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Chlamydia pneumoniae Antigen; in wieder verschließbarem 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 saure Lösung, 0.4 N/l, 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 pneumoniae 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 pneumoniae IgM Positivkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Chlamydia pneumoniae IgM Cut-off Kontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Chlamydia pneumoniae 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 Waschorruchtung
- 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 pneumoniae 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 pneumoniae 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 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 100 ml 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 15 ml 0,4 N saure Lösung (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. 10 µl 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 Waschefekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe 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  $\pm$  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 pneumoniae 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 DU 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:*  $0.42 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.44 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.86 : 2 = \underline{0.43}$   
 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 Demeditec-Einheiten [DU]

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

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

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

## 10. TESTMERKMALE

### 10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert (DU)	Vk (%)
Pos. Serum	12	21.6	8.25
Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
Pos. Serum	24	1.16	4.01

### 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 beträgt >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 trachomatis 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:** Saure Lösung 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.

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

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per Chlamydia pneumoniae si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici della Chlamydia pneumoniae. 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 pneumoniae di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido soluzionale 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 pneumoniae (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della Chlamydia pneumoniae; 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.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido soluzione, 0.4 N/l, 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 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato Chlamydia pneumoniae 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 pneumoniae IgM Controllo positivo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Chlamydia pneumoniae IgM Controllo Cut-off\*\*\*:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Chlamydia pneumoniae 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 adesi antigeni inattivati della *Chlamydia pneumoniae*. 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 pneumoniae* 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. 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 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 soluzione*, 0.4 N/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/scongelamento.*

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 350 µl 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 100 µl di Coniugato Chlamydia pneumoniae 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 ( $20^{\circ} \dots 25^{\circ} \text{C}$ ).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ} \dots 25^{\circ} \text{C}$ ) al buio.**
10. Pipettare 100 µl 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 DU 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 e' 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 Demeditec [DU]

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

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

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

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

### 10.1. Precisione

Interdosaggio	n	Media (DU)	Cv (%)
Siero pos.	12	21.6	8.25
Intradossaggio	n	Media (E)	CV (%)
Siero pos.	24	1.16	4.01

### 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 pari a 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.

L'antigene di *Chlamydia pneumoniae* adeso ai pozzetti comprende corpi elementari. Non è quindi possibile escludere una reazione crociata con *Chlamydia trachomatis* con sieri contenenti anticorpi per LPS e MOMP.

## 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 soluzione 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.

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

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.

**SCHEME OF THE ASSAY****Assay 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)					

<b>Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos / Legenda dos Símbolos</b>	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / 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 / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote / Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE / Marca CE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
<b>MTP</b>	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca. / Microplaca
<b>CONJ</b>	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado / Conjugado
	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo / Soro de controlo negativo
	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo / Soro de controlo positivo
	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off / Soro de controlo Cut-off
<b>DIL M</b>	Sample diluent buffer IgM/ IgM-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgM/ soluzione tampone per i campioni IgM/ solución tampón para muestras IgM / Tampão diluente para amostras IgM
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante / Solução de paragem
<b>SUB TMB</b>	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB / Solução substrato TMB
<b>WASHBUF 20x</b>	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20 / Solução de lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes