

Chlamydia trachomatis

IgG EIA



Instructions for use (English)
Notice d'utilisation (Français)
Gebrauchsanleitung (Deutsch)



 Ani Labsystems Ltd. Oy
Tiilitie 3, FIN-01720 Vantaa, Finland
Tel. +358-20-155 7523, Fax +358-20-155 7521
E-mail: sales@anilabsystems.com
www.anilabsystems.com

12.10.2009

Instructions for use

For *in vitro* diagnostic use only

Chlamydia trachomatis IgG EIA

A solid-phase enzyme immunoassay for the detection of IgG antibodies to *Chlamydia trachomatis* in human serum or plasma.

CONTENTS

	Page
INTENDED USE	2
INTRODUCTION	2
PRINCIPLE OF THE TEST	2
KIT CONTENTS	2
REAGENT PREPARATION	3
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	3
SAMPLE COLLECTION AND HANDLING	3
PRECAUTIONS	4
TEST PROCEDURE	4
RESULTS	5
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	5
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	5
TROUBLE SHOOTING	7
REFERENCES	21
RELATED PRODUCTS	22
SYMBOLS USED	22

INTENDED USE

Ani Lab systems' Chlamydia trachomatis IgG test has been developed for the detection of species specific IgG antibodies to *Chlamydia trachomatis* in human serum or plasma.

INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis is a leading cause of sexually transmitted infections. It is a major cause of pelvic inflammatory disease (PID), which is a common name for different kind of infections of the uterus, fallopian tubes and adjacent pelvic structures. PID has severe long-term sequelae, specifically tubal factor infertility and ectopic pregnancy. Many PID cases are asymptomatic or minimally symptomatic but may still cause permanent tubal damage (1). Therefore screening for PID causing microorganisms, specially *Chlamydia trachomatis*, helps in prevention of these long-term consequences.

Chlamydia trachomatis infection has also been associated with reactive arthritis (2).

The accurate diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection by cell culture, antigen detection or DNA/PCR is often complicated and expensive. The diagnosis of a passed or complicated infection is not always possible by using the above mentioned techniques.

The alternative method for clinical diagnosis is to measure antibodies to *Chlamydia trachomatis* from serum or other secretions. However, the detection of *Chlamydia trachomatis* specific antibodies in human is complicated due to the common structures of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* and the high prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in population. Common structures may lead to cross reactions in serological tests.

Ani Lab systems' *Chlamydia trachomatis* species specific EIA tests are based on synthetic peptides derived from the *C. trachomatis*-specific variable domain of MOMP (major outer membrane protein). This allows the screening and diagnosing of *Chlamydia trachomatis* infections without interference of *Chlamydia pneumoniae* antibodies (3). For complete diagnosis of acute and chronic infections it is important to measure both IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis*.

Microimmunofluorescence (MIF) has been the common method for the *C. trachomatis* serology. It has been shown that the seroprevalence rates of peptide based EIA assays are comparable to the MIF assay (4). EIA tests are, however, less laborious, less expensive and possible to use in automates.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of Ani Lab systems' Chlamydia trachomatis EIA kit is based on an indirect solid-phase enzyme immunoassay with horseradish peroxidase as the marker enzyme. The assay proceeds according to the following reactions.

When present in patient serum *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies combine with *Chlamydia trachomatis* peptides attached to the polystyrene surface of the microplate wells. Residual patient sample is removed by washing and horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG (sheep) is added. Unbound conjugate is washed off and a colourless enzyme substrate (H₂O₂) containing the chromogen (TMB) is added. The enzyme reaction of chromogen/substrate produces a coloured end product. Enzyme-chromogen/substrate reaction is terminated with acid (H₂SO₄). The colour intensity is directly proportional to the concentration of *Chlamydia trachomatis* antibodies in a patient sample.

KIT CONTENTS

- Reagents are stored between +2°C and +8°C.
- The expiration date is printed on each component label and on the package. Do not use reagents after the expiration date.
- Avoid excessive exposure to light. This is merely a precaution. The light sensitive reagents are the conjugate and the TMB-substrate solution, the latter one is packaged in nontransparent plastic vial for protection.
- The following reagents can be interchanged between Ani Lab systems' Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae and Bordetella pertussis IgG, IgA and IgM kits and

different lots. These reagents can also be ordered separately (see Product list):

- Washing solution
- Stopping solution
- TMB- Substrate solution

- 1 MICROPLATE, 12 strips x 8 wells
Coated microplate
- 2 SAMPLE DILUENT, 30 ml
Tris buffered saline with proprietary additives, a blue colouring reagent, and 0.05 % Bronidox® as preservative.
- 3a NEGATIVE CONTROL, 1 ml
Chlamydia trachomatis antibody negative human serum with 0.05 % Bronidox® as preservative.
- 3b POSITIVE CONTROL, 1 ml
Chlamydia trachomatis antibody positive human serum with 0.05 % Bronidox® as preservative.
- 4 CONJUGATE, 40 ml
Buffered salt solution with proprietary additives, a red colouring reagent, horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG (sheep) with 0.1% N-Methylisothiazolone as preservative.
- 5 TMB-SUBSTRATE SOLUTION, ready for use, 2 x 18 ml
Citrate buffered solution of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide with proprietary additives and 0.01 % Kathon CG as preservative.
- 6 STOPPING SOLUTION, 25 ml
0.45 M H₂SO₄
- 7 WASHING SOLUTION, 100 ml
Concentrated citrate buffered saline, with proprietary additives, and 0.05 % Bronidox® as preservative.

INCUBATION COVERS, 2 pcs
DISPOSABLE REAGENT BASINS, 6 pcs

REAGENT PREPARATION

Reagent	Preparation	Stability of opened/ diluted reagents (+2°C to +8°C)
1 Coated microplate	Ready for use	6 months *)
2 Sample diluent	Ready for use	6 months *)
3a Negative control	Ready for use	6 months *)
3b Positive control	Ready for use	6 months *)
4 Conjugate	Ready for use	6 months *)
5 TMB-Substrate solution	Ready for use	6 months *) Discard unused reagent. A deep blue colour present in the substrate solution indicates that the solution has been contaminated and must

6 Stopping solution	Ready for use	be discarded. 6 months *)
7 Washing solution concentrate (10x)	Dilute the concentrate (vial 7)	6 months *)
Washing solution	1+9 (1:10) with distilled water	1 month at +4°C or 1 week at room temperature

*) Once the microplate foil-package is opened it should be resealed tightly with the desiccant: fold the opened end a few times and seal air-tightly with tape over the whole length of the opening. The stability of the opened reagents is the maximum only if they are stored properly at +2°C to +8°C. High environmental temperature and contamination may decrease the stability.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Distilled or deionized water, preferably sterile.
- Graduated cylinders for reagent dilution.
- Vials to store the diluted reagents.
- Precision pipettes (one channel eg. 0.5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl ranges and multi-channel 50-300 µl)
- Paper towels or absorbent paper.
- Timer, 60 min range.
- Microplate incubator
- Microplate photometer, 450 nm
- Microplate washer
- Sodium hypochlorite solution, free available chlorine 50-500 mg/l.
- Disposable gloves.

SAMPLE COLLECTION AND HANDLING

Chlamydia trachomatis IgG and IgA EIAs can be performed only from serum and plasma (EDTA, Li-Heparin) samples. Paired samples should be collected in the similar way. The use of citrate and ACD plasma is not allowed due to dilution of the plasma with the anticoagulant which may affect the clinical interpretation.

Serum and plasma samples should be refrigerated (+4°C) after collection or, if the test cannot be performed within 1 week, frozen (-20°C or -70°C, which is preferred). **Samples should not be repeatedly frozen and thawed.**

Do not use sodium azide as preservative because it inactivates horseradish peroxidase.

Heat inactivation of serum or plasma (+56°C, 30 min.) may cause an unspecific result.

Microbially contaminated, grossly hemolyzed or hyperlipemic serum and plasma may give erroneous results. Long storage of serum (frozen over one year) may cause the formation of lipid aggregates. These aggregates may cause an unspecific result.

PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only.

Warning - POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL:

All human materials used in the preparation of the calibrators/controls in the kit have been tested for the presence of the antibodies to HIV (Human Immunodeficiency Virus) and HCV (Hepatitis C Virus) as well as Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and found to be non-reactive. Because no test method can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus, HCV, or other infectious agents are absent, these calibrators and controls as well as samples should be handled at the Biosafety level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood sample in the Centers for Disease Control/National Institutes for Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007 (6).

Discard all materials and samples as if capable of transmitting infection. The preferred method of disposal is autoclaving for a minimum of one hour at 121°C. Liquid wastes not containing acid and neutralized waste may be mixed with sodium hypochlorite in volumes such that the final mixture contains 50-500 mg/l free available chlorine. Allow 30 minutes for decontamination to be completed. Spills should be wiped off thoroughly using either an iodophor disinfectant or sodium hypochlorite solution. Materials used to wipe off spills should be added to biohazardous waste matter for proper disposal. Reusable glassware must be disinfected, washed out and rinsed free of detergents.

Liquid waste containing acid must be neutralized with a proportional amount of base prior to the addition of sodium hypochlorite. Stopping solution (vial 6) contains 0.45 M sulphuric acid, avoid contact with skin and eyes.

Wear disposable gloves while handling samples and kit reagents. Afterwards wash hands carefully. Never pipette by mouth.

Do not mix or interchange reagents from different lots, except washing solution, stopping solution, and TMB-substrate solution. Do not interchange vial caps.

Once the assay has been started, all subsequent steps should be performed without interruption. Do not let the wells dry once the assay has been started.

Do not reuse a strip of the microplate even if some wells were not used.

Accurate and precise pipetting, as well as following the exact time and temperature requirements, is essential.

TEST PROCEDURE

Preliminary preparations

- Bring the reagents and microplates to room temperature (+20°C to +25°C) before starting the assay.
- Prewarm the incubator to +37°C.

- Note: When using an automate, please check that the real incubation times are not too long

STEP I

- Pipette 180 µl of the sample diluent (vial 2) into each well²
- Pipette 20 µl of sample diluent as reagent blank, 20 µl of samples, 20 µl of negative control (vial 3a) and 20 µl of positive control (vial 3b). Mix well.¹
- Cover the plate with plastic sheet. Incubate for 30 (± 3) minutes at +37°C (±1 °C).
- Wash 5 x 400 µl / well³

STEP II

- Pipette 200 µl of the conjugate (vial 4) into each well²
- Cover the plate with plastic sheet. Incubate for 30 (± 3) minutes at +37°C (±1 °C).
- Wash 5 x 400 µl / well³

STEP III

- Add 200 µl of the TMB-substrate solution (vial 5) into each well.²
- Incubate for 15 (±1) minutes at room temperature (+20-25 °C) in dark.

STEP IV

- Stop the enzyme-substrate reaction by adding 100 µl of stopping solution (vial 6) into each well.⁴
- Measure the absorbances immediately at 450 nm /reference 620 nm (590 -690 nm)⁵

NOTES

The use of an 8-channel pipette device is recommended for improved efficiency and precision.

1. Use of duplicates is preferable, especially for the Positive control. After pipetting of the sample diluent into the wells, pipette first the samples, and then the controls. Use a new pipette tip for each sample. Mix well: insert the pipette tip into sample diluent and mix the sample/control gently while pipetting to avoid gradient. Do not touch the walls of the wells with pipette tips when mixing the samples

2. **Avoid contamination:** When removing aliquots from the reagent vials, use aseptic technique to avoid contamination. Pour needed amount of the sample diluent, **conjugate and TMB-substrate solutions into a disposable basin for reagents** (6 pieces supplied with the kit). **Discard any unused solutions; do not pour it back to the vials.** Do not touch the walls of the wells with pipette tips when adding TMB-substrate.

3. Washing may be performed manually or with a washer. Washing solution is recommended to stay in wells for 15-30 seconds during each cycle. After the washing step tap the inverted plate a few times on the paper towel.

4. When stopping reagent is added the blue colour of positive reaction should turn yellow. Green colour indicates that the stopping reagent is not properly mixed in the well. If needed mix the wells before measuring

5. The absorbance of the reagent blank has to be measured to check that it falls within the Quality Control values

RESULTS

Quality Control Values

Before calculating the results, make sure that the absorbance values obtained for the reagent blank and controls fall within the Quality Control guidelines. If the blank and the controls do not give expected values, the results are invalid and the samples should be retested.

Quality control values

QC Sample	Expected value at 450 nm (in absorbance units)
Reagent blank	< 0.10
Negative control NC	< 0.20 *)
Positive control PC	0.70 ≤ PC ≤ 2.00 *)

*) = The reagent blank absorbance has already been subtracted from these values.

Calculation of the Results

Appreviations:

- Arb = Mean absorbance of the reagent blank
- Apc = Mean absorbance of the positive control
- As = Mean absorbance of the sample
- CO = Cut-off value in absorbance units

Use the following formula for calculating the **CO** (cut-off) and **S/CO** (signal to cut-off) values:

$$CO = 0.6 \times (Apc - Arb)$$

$$S/CO = (As - Arb) / CO$$

Example:

Sample	Mean A at 450 nm
Reagent blank	0.030
Positive control	1.370
Sample 1	1.520

$$CO = 0.6 \times (1.370 - 0.030) = 0.804$$

$$S/CO \text{ (Sample 1)} = (1.520 - 0.030) / 0.804 = 1.85$$

Interpretation of the Results

- S/CO < 1.0 **Negative.**
A negative result indicates that the sample tested either contains no IgG antibodies to *Chlamydia trachomatis* or that the antibody level is not yet detectable. Sample may contain IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis*.
- 1.0 ≤ S/CO < 1.4 **Equivocal.**
An equivocal result indicates that presence of anti-*Chlamydia trachomatis* IgG antibodies can not be definitely established. In case of clinical suspicion retest antibodies after two weeks.
- S/CO ≥ 1.4 **Positive.**
A positive result may indicate either past or acute on-going infection.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Because no single method leads to the definitive diagnosis, the results of the present method should be interpreted in conjunction with the clinical condition and other laboratory methods.

It is recommended that the assay is performed by qualified and trained laboratory technician.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Reproducibility

Table 1. Within run reproducibility

C. trachomatis IgG Sample no	replicates n	mean absorbance	SD	CV %
1	24	0.993	0.048	4.8
2	24	1.251	0.061	4.9
3	24	1.694	0.098	5.8

Table 2. Between run reproducibility

C. trachomatis IgG Sample no	replicates within-run	run n	mean abs	mean S/CO	SD S/CO	CV %
1	4	10	1.053	1.14	0.06	4.9
2	4	10	1.286	1.39	0.06	4.0
3	4	10	1.375	1.49	0.07	4.6
4	4	10	1.739	1.88	0.07	3.9

Summary of the evaluation studies

Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the Ani Lab systems' species specific *Chlamydia trachomatis* IgG and IgA EIAs was compared to another commercial *Chlamydia trachomatis* IgG and IgA assay using serum samples (n=56) from clinically verified Pelvic Inflammatory Disease (PID) patients.

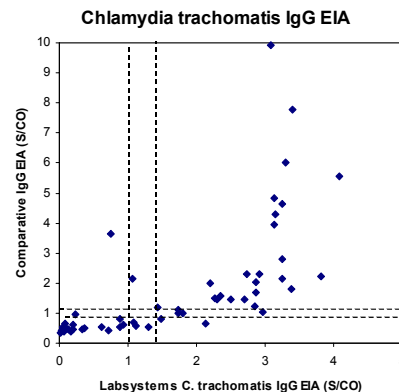


Figure 1. Correlation of S/CO values between the Ani Lab systems C. trachomatis IgG EIA and another peptide-based method.

Table 3. The agreement of interpretation between the Ani LabSystems C. trachomatis IgG EIA and another peptide-based method.

IgG		Labsystems	
		Pos	Neg
Comparative	Pos	24	2
	Neg	6	24

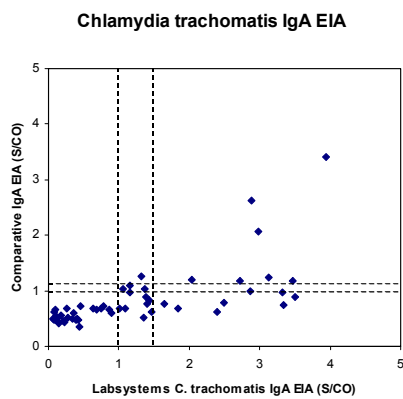


Figure 2. Correlation of S/CO values between the Ani LabSystems C. trachomatis IgA EIA and another peptide-based method.

Table 4. The agreement of interpretation between the Ani LabSystems C. trachomatis IgA EIA and another peptide-based method.

IgA		Labsystems	
		Pos	Neg
Comparative	Pos	9	2
	Neg	11	34

The diagnostic sensitivities of Ani LabSystems' Chlamydia trachomatis IgG and IgA EIAs together with another commercial peptide-based C.trachomatis IgG and IgA EIA assays were evaluated in a study by Verkooyen and his group (5). Sera from patients with PCR-proven *Chlamydia trachomatis* infection were tested as well as a group of blood donors as a negative control group.

In a group of patients with PCR-proven *Chlamydia trachomatis* infection about 70 % showed positive IgG and less than 50 % positive IgA response (Table 5).

In this study less than 100 % of PCR-positive samples had *C. trachomatis* antibodies. A possible explanation for this is that the immune system has not had enough time to response.

Table 5. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* IgG and IgA antibodies using peptide-based EIA assays from Ani LabSystems and from another commercial manufacturer (5)

	Patients with PCR-confirmed active <i>trachomatis</i> infection, n=324	Blood donors, n=443
	Ctra IgG positive (%)	
Ani LabSystems EIA	69	6
Comparative EIA	68	6
	Ctra IgA positive (%)	
Ani LabSystems EIA	38	5
Comparative EIA	48	5

Diagnostic specificity

The diagnostic specificity of the Ani LabSystems species specific Chlamydia trachomatis IgG and IgA EIAs was compared to another commercial C. trachomatis IgG and IgA assay using serum samples from children 1-5 years old (n=123). The respective results are in Fig. 3 and 4.

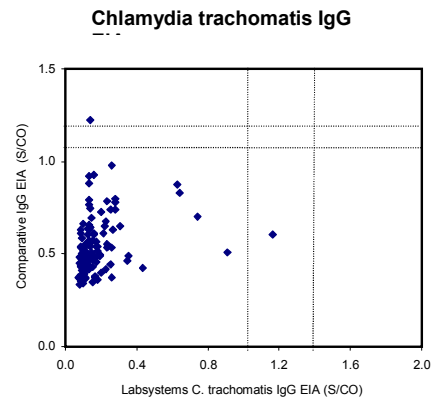


Figure 3. Correlation of S/CO values between the Ani LabSystems C. trachomatis IgG EIA and another peptide-based method.

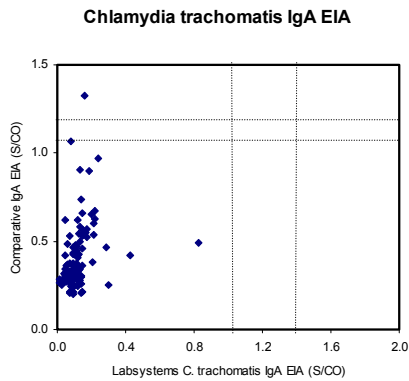


Figure 4. Correlation of S/CO values between the Ani Lab systems C. trachomatis IgA EIA and another peptide-based method.

Conclusion

The Ani Lab systems C. trachomatis IgG and IgA kits show good diagnostic sensitivity and specificity.

TROUBLE SHOOTING

Cause/Error	Solution
BLANK IS TOO HIGH	
1. Contamination, spills from other wells	Avoid contamination
2. Washing solution concentrate was not diluted correctly	Should be diluted 1:10 (1+9)
3. Poor washing	Check your washer
4. Contamination of the TMB-substrate in the reaction basin.	Keep the residual substrate solution until the test is completed. Check if the substrate in the reagent basin turns blue. This will indicate contamination.

Cause/Error	Solution
ABSORBANCE VALUES ARE LOW	
1. Incubation temperature is too low	Incubate at 37°C ±1°C. The heating efficiency of different incubators vary widely. The incubator with efficient and homogeneous warming is preferred
2. Contamination of conjugate with spills of human sera.	All absorbance values are low. Only nanoliters of sera are enough to block the activity of the conjugate. Pay special attention to prevent contamination
3. Contamination of wells with spills of human sera.	Few individual absorbance values are (very) low. Pay special attention to prevent contamination

4. Reagents are deteriorated *due to contamination or HRP deterioration in the conjugate *due to improper storage	When removing aliquots from the reagent vials, use aseptic technique to avoid contamination or erroneous results may occur. Protect reagents from excessive light Store at +4°C
5. Reagents are not warmed up to room temperature before starting	Should be +20...+25°C when starting the assay
6. Incubation time is too short	Incubate 1h (+/-5min) or 30 min.
7. Interchange of reagents	Do not mix or interchange reagents from different lots
8. Stopping solution is not mixed properly	Mix carefully before measurement

POSITIVE CONTROL HAS TOO LOW ABSORBANCE VALUES	
Cause/Error	Solution
1. The control is not mixed with the sample diluent while pipetting	After dispensing the control rinse the pipette tip with sample diluent

Cause/Error	Solution
POOR PRECISION	
1. Pipettes are not properly calibrated	Check calibration of the pipettes
2. Improper washing due to contamination of tips of the washer	Clean regularly tips of the washer
3. The plate is allowed to stay too long after washing (drying of the plate)	Follow strictly the kit instructions
4. Heterogeneous warming of the plate	Service Incubator /Shaker or incubator
5. Sample serum/plasma is not mixed properly with sample buffer	While pipetting mix the sample with sample buffer
6. Stopping solution has not been mixed properly before measurement	Mix the plate before measuring

TOO HIGH ABSORBANCE VALUES	
Cause/Error	Solution
1. Incubation temperature is too high	Incubate at 37°C (± 1°C). The heating efficiency of incubators varies widely. The incubator with efficient and even warming is preferred
2. Incubation time is too long. This may be the case especially with automatic systems.	Check the real incubation times (should be 30 (±3) min, 30 (±3) min, 15 (±1) min)
3. Negative control is too high. Contamination, spills from other wells, interchange of the vial caps	Avoid contamination

Notice d'utilisation

Pour usage diagnostic *in vitro* uniquement

Test EIA IgG Chlamydia trachomatis

Test immuno-enzymologique pour la détection d'anticorps IgG *Chlamydia trachomatis* dans le sérum ou le plasma humain.

CONTENU

UTILISATION	8
INTRODUCTION	8
PRINCIPE DU TEST	8
CONTENU DU KIT	8
PREPARATION DES REACTIFS	9
MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI	9
PRELEVEMENT/ MANIPULATION DES ECHANTILLONS	9
PRECAUTIONS	10
PROCEDURE DU TEST	10
RESULTATS	11
LIMITES DE LA METHODE	11
PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES	11
RISQUES D'ERREUR	13
LITERATUR	21
PRODUITS AFFILIÉS	22
SYMBOLES UTILISÉS	22

UTILISATION

Le test IgG Chlamydia trachomatis d'Ani Labsystems a été développé pour la détection d'anticorps IgG *Chlamydia trachomatis* dans le sérum humain ou dans le plasma.

INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis est une des causes principales d'infections sexuellement transmissibles. C'est la cause principale de la maladie inflammatoire pelvienne (PID : Pelvic Inflammatory Disease), qui dénomine aussi différentes sortes d'infections de l'utérus, des trompes de Fallope et des structures pelviennes adjacentes du PID provoque de sévères séquelles à long terme, spécifiquement l'infertilité des trompes et des grossesses ectopiques. De nombreux cas de PID sont asymptomatiques ou légèrement symptomatiques mais peuvent quand même causer des dégâts permanents sur les trompes(1). Par conséquent, dépister la PID causée par des microorganismes, spécialement *Chlamydia trachomatis*, aide à la prévention de ces conséquences à long terme.

L'infection à *Chlamydia trachomatis* a également été associée avec l'arthrite réactive(2).

Le diagnostic exact de l'infection à *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire, détection d'antigène ou ADN/PCR est souvent compliqué et coûteux. Le diagnostic d'une

infection ancienne ou compliquée n'est pas toujours possible en utilisant les techniques mentionnées ci-dessus.

La méthode alternative pour un diagnostic clinique est de mesurer les anticorps de *Chlamydia trachomatis* à partir de sérum ou autres sécrétions. Cependant, la détection d'anticorps spécifiques *Chlamydia trachomatis* chez l'humain est compliquée dû aux structures communes de *Chlamydia trachomatis* et de *Chlamydia pneumoniae* et de la prévalence élevée d'anticorps *Chlamydia pneumoniae* dans les populations. Les structures communes peuvent conduire à des contre réactions dans les tests sérologiques.

Les tests EIA *Chlamydia trachomatis* d'Ani Labsystems sont basés sur des peptides synthétiques dérivées de *C. trachomatis*-specific de MOMP (major outer membrane protein). Cela permet le dépistage et le diagnostic des infections *Chlamydia trachomatis* sans interférence d'anticorps de *Chlamydia pneumoniae*(3). Pour un diagnostic complet d'infections chroniques et aiguës, il est important de mesurer les deux anticorps IgG et IgA de *Chlamydia trachomatis*.

La microimmunofluorescence (MIF) a été la méthode standard pour la sérologie de *C. trachomatis*. Il a été démontré que les taux de séroprévalence des tests EIA basés sur les peptides sont comparables au test MIF (4). Les tests EIA sont, cependant, moins laborieux, moins coûteux et possibles à utiliser avec des automates.

PRINCIPE DU TEST

Le principe du kit EIA Chlamydia trachomatis d'Ani Labsystems est basé sur une détection immunologique indirecte utilisant la peroxidase de raifort et son substrat pour l'amplification du signal. L'analyse se déroule de la façon suivante:

Les anticorps IgG dirigés contre *Chlamydia trachomatis* présents dans l'échantillon du patient, se fixent sur l'antigène de *Chlamydia trachomatis* attachés sur la surface en polystyrène des puits de la microplaque. Le reste de l'échantillon est éliminé par lavage puis un anticorps (de mouton) anti-IgG humain couplé à la peroxydase de raifort est ajouté. L'excès d'anticorps anti-IgG non fixé est éliminé par lavage et le substrat incolore de l'enzyme (H₂O₂) contenant le chromogène (TMB) est ajouté. La réaction enzymatique avec le chromogène entraîne la coloration du liquide. La coloration est arrêtée par l'ajout d'une solution acide (H₂SO₄). L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-*Chlamydia trachomatis* présents dans l'échantillon du patient.

CONTENU DU KIT

–Les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C.

–La date d'expiration est imprimée sur chaque composant ainsi que sur l'emballage. Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.

–A titre de précaution, éviter toute exposition prolongée des composants à la lumière. Les composants sensibles à la lumière sont l'anticorps couplé à la peroxidase et le

substrat-TMB ce dernier est emballé dans un flacon opaque.

-Les réactifs suivants peuvent être interchangés entre les kits Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae et Bordetella pertussis IgG, IgA et IgM d'Ani Labsystems et entre les lots d'un même kit. Ces réactifs peuvent aussi être commandés séparément (cf. la liste de produits) :

- Solution de substrat-TMB
- Solution stop
- Solution de lavage

1 MICROPLAQUE , 12 x 8 puits
Couverte de l'antigène

2- DILUANT ECHANTILLON, 30 ml

Tampon de dilution de l'échantillon. Tampon Tris salin contenant des réactifs additionnels, un agent colorant bleu et un agent conservateur (Bronidox®0.05%).

3a - CONTROLE NEGATIF, 1 ml

Sérum humain négatif négatif pour *Chlamydia trachomatis* contenant un agent conservateur (Bronidox® 0.05%).

3b- CONTROLE POSITIF, 1 ml

Sérum humain positif contenant un anticorps *Chlamydia trachomatis* et un agent conservateur (Bronidox® 0,05%).

4- CONJUGUE , 40 ml

Solution tampon contenant un anticorps de mouton dirigé contre les IgG humaines couplé à la peroxydase de raifort, des réactifs additionnels, un agent colorant rouge et un agent conservateur (N-Methylisothiazolone 0.1%).

5- SUBSTRAT - TMB, prêt à l'emploi, 2 x 18 ml

Solution de substrat prête à l'emploi. Tampon citrate contenant le 3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine et le peroxyde d'hydrogène ainsi qu'un agent conservateur (Kathon CG 0.01%).

6- SOLUTION D'ARRET , 25 ml

Solution d'arrêt de la réaction. 0.45 M H₂SO₄

7- SOLUTION DE LAVAGE , 100 ml

Solution de lavage concentrée. Tampon citrate contenant des réactifs additionnels et un agent conservateur (Bronidox® 0.05%).

FILMS PLASTIQUES AUTOCOLLANT, 2 pcs

CUVETTES POUR RÉACTIFS, 6 pcs

PREPARATION DES REACTIFS

Réactif	Préparation	Stabilité des réactifs ou dilués (+2°C à +8°C)
1 Microplaque couverte de l'antigène	prêt à l'emploi	6 mois *
2 Diluant échantillon	prêt à l'emploi	6 mois *
3a Contrôle négatif	prêt à l'emploi	6 mois *
3b Contrôle positif	prêt à l'emploi	6 mois *

4 Conjugué	prêt à l'emploi	6 mois * - Eliminer le reste de substrat présent dans le bassin. Une coloration bleue du substrat indique une contamination qui le rend inutilisable. 6 mois *
5 Substrat - TMB		
6 Solution d'arrêt	prêt à l'emploi	6 mois *
7 Solution de lavage concentrée (10x)	Diluer la solution concentrée (flacon 7)	
Solution de lavage reconstituée	1+9 (1:10) avec de l'eau distillée	1 mois à +4°C ou 1 semaine à température ambiante

*) Lorsque l'emballage des microplaques est ouvert, il doit être refermé hermétiquement avec le sachet dessiccateur: plier plusieurs la partie ouverte de l'emballage et la fermer avec un ruban adhésif sur toute la longueur. La stabilité des réactifs ouverts est de 6 mois s'ils sont conservés correctement entre +2°C et +8°C. Une température supérieure ou une contamination peuvent diminuer leur stabilité

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Eau distillée ou déionisée, de préférence stérile.
- Eprovettes graduées pour la dilution des réactifs.
- Fioles pour le stockage des réactifs dilués.
- Pipettes de précision (par ex. 0.5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl et une multi-canaux 50-300 µl)
- Papier ou tissu absorbant.
- Un minuteur couvrant au minimum 60 min.
- Un incubateur de microplaque.
- Un lecteur de microplaque, 450 nm
- Un laveur de microplaque.
- De l'eau de javel, chlore libre 50-500 mg/l.
- Des gants à usage unique.

PRELEVEMENT/ MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Les tests EIA IgG et IgA Chlamydia trachomatis peuvent être réalisés seulement à partir d'échantillon de sérum et plasma (EDTA, Lithium-héparine), toutefois des échantillons appariés doivent être collectés de la même manière. L'utilisation de plasma citrate et ACD est interdite due à la dilution du plasma avec l'anticoagulant qui peut erroner l'interprétation clinique.

Les échantillons de sérum et de plasma doivent être réfrigérés (+4°C) après le prélèvement, ou, si le test ne peut pas être effectué dans la semaine qui suit, congelés de préférence à -20°C ou -70°C (sans distinction). **Les échantillons ne doivent pas être congelés-décongelés à plusieurs reprises.**

Ne pas utiliser l'azide de sodium comme conservateur, c'est un inhibiteur de la peroxydase.

L'inactivation par la chaleur du sérum ou du plasma (+56°C, 30 min.) peut entraîner de faux résultats.

Les sérums ou plasmas contaminés par des microbes, hyperlipémiques ou sur-hémolysés peuvent entraîner de faux résultats. De même, la longue conservation (temps de congélation supérieur à un an) peut entraîner la formation d'agrégats lipidiques qui peuvent perturber les résultats.

PRECAUTIONS

Pour usage en diagnostic *in vitro* uniquement.

Avertissement - MATERIEL BIOLOGIQUE POTENTIELLEMENT DANGEREUX :

Tout matériel humain utilisé pour la préparation des contrôles et étalons contenus dans le kit ont été testés pour la présence d'anticorps anti-VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) et HCV (Virus de l'Hépatite C) ainsi que pour la présence d'antigènes de surface de l'Hépatite B (HBsAg) et sont négatifs. Aucune méthode ne permet d'affirmer de manière catégorique que le VIH, le VHC, le VHB et d'autres agents infectieux sont absents. Par conséquent, les sérums de référence ainsi que les échantillons des patients doivent être manipulés selon les règles de Biosécurité Niveau 2 comme tout sérum ou sang humain potentiellement infecté. Ces recommandations sont données dans le manuel des Centres de contrôle des maladies / Instituts Nationaux de Santé, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2007 (6).

Éliminer tous les matériels et les échantillons comme s'ils étaient capables de transmettre une infection. La méthode de désinfection préconisée est un autoclavage d'au moins une heure à 121°C. Les déchets liquides non acides ou neutralisés peuvent être mélangés à une solution d'hypochlorite de sodium pour une concentration finale en chlore libre comprise entre 50-500 mg/l. 30 minutes minimum sont nécessaires à une désinfection.

Les éclaboussures doivent être soigneusement nettoyées avec un désinfectant iodophore ou une solution d'hypochlorite de sodium. Le matériel utilisé pour ce nettoyage doit être traité comme les autres déchets biologiques et jeté dans les conteneurs appropriés. La verrerie doit être soigneusement désinfectée, lavée et rincée pour éliminer toute trace de détergent avant d'être réutilisée.

Les liquides acides doivent être neutralisés avec une quantité suffisante de solution basique avant l'ajout d'hypochlorite de sodium. La solution stop (flacon 6) contient 0,45 M d'acide sulfurique, éviter le contact avec la peau et les yeux.

Porter des gants de laboratoire à usage unique lors de la manipulation des échantillons ou des réactifs du kit. Se laver les mains avec soin après chaque manipulation. Ne jamais pipeter avec la bouche.

Ne pas mélanger ou interchanger les réactifs issus de lots différents, sauf pour les solutions de lavage, de substrat-TMB et stop. Ne pas interchanger les bouchons des flacons.

Après le début du test, il est indispensable de réaliser toutes les étapes sans interruption et de ne pas laisser sécher les puits.

Ne pas réutiliser une bande de la microplaque même si certains puits n'ont pas été utilisés.

Il est essentiel de pipeter de façon précise et de respecter les temps et températures indiqués.

PROCEDURE DU TEST

Préparations préliminaires

– **Préchauffer les réactifs et les microplaques à température ambiante (+20°C à +25°C) avant le début de la procédure.**

- Préchauffer l'incubateur à +37°C.

- Note: lors de l'utilisation d'un automate, vérifier que les temps réels de l'incubation ne sont pas trop longs.

ETAPE I

- Pipeter 180 µl du diluant échantillon (flacon 2) dans chaque puit de la microplaque²

- Pipeter 20 µl de diluant d'échantillon pour le blanc, 20 µl d'échantillons, 20 µl du contrôle négatif (flacon 3a) et 20 µl du contrôle positif (flacon 3b). Bien mélanger.¹

- Couvrir la microplaque avec un film plastique. Incuber 30 (± 3) minutes à +37°C (± 1°C°).

- Laver 5 x 400 µl/puit³

ETAPE II

- Pipeter 200 µl du conjugué (flacon 4) dans chaque puit²

- Couvrir la microplaque avec le film plastique. Incuber 30 (± 3) minutes à +37°C (± 1°C°).

- Laver 5 x 400 µl/puit³

ETAPE III

- Ajouter 200 µl de la solution de substrat-TMB (flacon 5) dans chaque puit.²

- Incuber 15 (± 1) minutes dans l'obscurité à température ambiante (+20-25 C°).

ETAPE IV

- Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt (flacon 6) dans chaque puits.⁴

- Mesurer l'absorbance immédiatement à 450 nm / référence 620 nm (590 – 690 nm)⁵

NOTE:

Pour plus de précision et d'efficacité, il est recommandé d'utiliser une pipette multicanaux (8 canaux).

1. Pipeter de préférence en dupliqué surtout le contrôle positif. Après avoir pipeté le diluant échantillon dans les puits de la microplaque, pipeter d'abord les échantillons, puis les contrôles. Utiliser un nouveau cône de pipette pour chaque échantillon. Bien mélanger : insérer le bout de la pipette dans le diluant et mélanger l'échantillon/contrôle doucement par mouvement de va et vien afin d'éviter tout gradient. Ne pas toucher les parois des puits avec le bout de la pipette lors du mélange des échantillons.

2. **Afin d'éviter toute contamination:** travailler en asepsie lors du prélèvement des aliquotes à partir des flacons de réactifs. Verser la quantité nécessaire de diluant pour échantillons, **de conjugué et de substrat TMB** dans un bassin à usage unique (le kit contient 6 bassins). **Jeter le reste de la solution inutilisée, ne pas le verser dans**

le flacon. Ne pas toucher les puits ou faire éclabousser les échantillons en pipétant le substrat-TMB.

3. Le lavage peut être effectué manuellement ou par un laveur automatique. Il est recommandé de laisser la solution de lavage de 15 à 30 secondes dans les puits à chaque cycle. Après le dernier lavage, tapoter la microplaque retournée sur du papier absorbant.

4. Lorsque la solution stop est ajoutée, la couleur bleue doit devenir jaune. La couleur verte indique que la solution stop n'est pas correctement mélangée dans le puit. Si nécessaire, mélanger les puits avant de mesurer.

5. L'absorbance du blanc doit être mesurée afin de vérifier qu'elle corresponde avec les valeurs du Contrôle de Qualité.

RESULTATS

Valeurs du Contrôle de Qualité

Avant de calculer les résultats, valider que les valeurs de l'absorbance obtenues par le blanc et les contrôles correspondent au Contrôle de Qualité. Si le blanc et les contrôles n'offrent pas les valeurs attendues, les résultats ne sont pas validés et les échantillons doivent être retestés.

Valeurs du contrôle qualité

QC Echantillon	Valeur attendue à 450 nm Densité optique DO
blanc	< 0.10
Contrôle négatif CN	< 0.20 *)
Contrôle positif CP	$0.70 < PC < 2.00$ *)

*) = L'absorbance du blanc a déjà été soustraite de ces valeurs.

Calcul des résultats

Abréviations

Ab = Moyenne absorbance du blanc
Acp = Moyenne absorbance du contrôle positif
Ae = Moyenne absorbance d l'échantillon
CO = Cut-off (limite de détection) dans l'absorbance des unités

Utiliser la formule suivante pour le calcul des valeurs du **CO**(cut-off) et **S/CO** (signal de cut-off) :

$$CO = 0.6 \times (Acp - Ab)$$

$$S/CO = (Ae - Ab) / CO$$

Exemple:

Echantillon	Moyenne à 450 nm
Blanc	0.030
Contrôle positif	1.370
Echantillon 1	1.520

$$CO = 0.6 \times (1.370 - 0.030) = 0.804$$

$$S/CO (\text{Echantillon 1}) = (1.520 - 0.030) / 0.804 = 1.85$$

Interprétation des résultats

S/CO < 1.0 : Négatif

Un résultat négatif indique soit que l'échantillon testé ne contient pas d'anticorps IgG *Chlamydia trachomatis*, soit que le niveau d'anticorps n'est pas encore détectable.

L'échantillon peut contenir des anticorps IgA *Chlamydia trachomatis*.

$1.0 \leq S/CO < 1.4$: Equivoque.

Un résultat équivoque indique que la présence d'anticorps anti- IgG *Chlamydia trachomatis* ne peut pas être entièrement établie. En cas de doute clinique, retester les anticorps après 2 semaines.

$S/CO \geq 1.4$: Positif.

Un résultat positif peut indiquer soit une infection ancienne, soit une infection en cours.

LIMITES DE LA METHODE

Comme aucune méthode ne peut conduire à un diagnostic définitif, les résultats de l'actuelle méthode doivent être interprétés en accord avec la clinique et autres méthodes de laboratoire.

Le test doit être utilisé par un technicien de laboratoire professionnel et expérimenté.

PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES

Reproductibilité

Tableau 1.Reproductibilité intra-essai

C.trachomatis IgG échantillon no	réplicats n	Abs.. moy.	SD	CV %
1	24	0.993	0.048	4.8
2	24	1.251	0.061	4.9
3	24	1.694	0.098	5.8

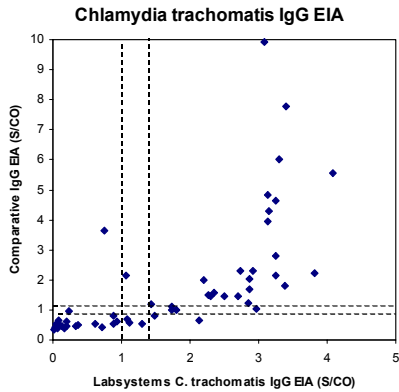
Tableau 2.Reproductibilité inter-essais

C. trachomatis IgG échantillon no	Répétitions par série	run	Abs. moy.	S/CO moy.	SD S/CO	CV %
1	4	10	1.053	1.14	0.06	4.9
2	4	10	1.286	1.39	0.06	4.0
3	4	10	1.375	1.49	0.07	4.6
4	4	10	1.739	1.88	0.07	3.9

Résumé des études d'évaluation

Sensibilité

La sensibilité du diagnostic des tests EIAs IgA et IgG *Chlamydia trachomatis* d'Ani Lab systems a été comparée à un autre test IgA et IgG *Chlamydia trachomatis* commercial, utilisant des échantillons de sérum (n=56) à partir de patients cliniquement diagnostiqués pour une maladie inflammatoire pelvienne (PID : Pelvic Inflammatory Disease).



Graphique 1. Correlation des valeur S/CO pour le test EIA IgG C. trachomatis d'Ani Lab systems et une autre méthode utilisant des peptides.

Tableau 3. La comparaison entre le test EIA IgG C. trachomatis d'Ani et une autre méthode utilisant des peptides.

IgG		Labsystems	
		Pos	Neg
Comparative	Pos	24	2
	Neg	6	24

Graphique 2. Correlation des valeurs S/CO entre le test IgA EIA C. trachomatis d'Ani Lab systems et une autre méthode utilisant des peptides.

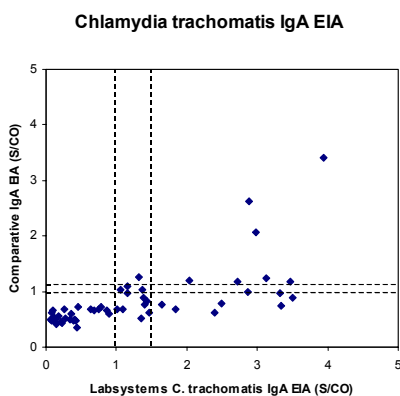


Tableau 4. La comparaison entre le test EIA IgA C. trachomatis d'Ani Lab systems et une autre méthode utilisant des peptides.

IgA		Labsystems	
		Pos	Neg
Comparative	Pos	9	2
	Neg	11	34

La sensibilité des tests EIA IgG et IgA Chlamydia trachomatis d'Ani Lab systems parallèlement à un autre test commercial EIA IgG et IgA C. trachomatis utilisant des peptides a été évaluées dans une étude de Verkooyen et son groupe(5). Des serums de patients ayant une infection *Chlamydia trachomatis* prouvée par PCR ont été testés ainsi qu'un groupe de donneurs de sang en tant que groupe contrôle négatif.

Dans le groupe des patients ayant une infection *Chlamydia trachomatis* prouvée par PCR, environ 70 % ont montré une réponse IgG positive et moins de 50 % une réponse IgA positive (Tableau 5).

Dans cette étude, moins de 100% des échantillons PCR-positif possédaient des anticorps anti - *C. trachomatis*. Une explication possible donnée est que le système immunitaire n'a pas eu assez de temps pour répondre.

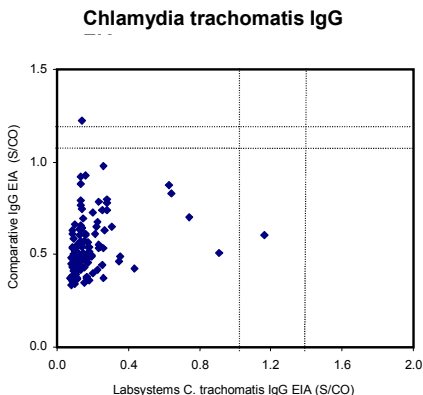
Tableau 5. La prévalence d'anticorps IgG et IgA *Chlamydia trachomatis* utilisant des tests EIA basés à sur des peptides Ani Lab systems et d'un autre fabricant(5) sont rapportés.

	Patients avec l'infection PCR-confirmée <i>trachomatis</i> infection, n=324	Donneurs de sang, n=443
Ctra IgG positive (%)		
Ani Lab systems EIA	69	6
Comparative EIA	68	6
Ctra IgA positive (%)		
Ani Lab systems EIA	38	5
Comparative EIA	48	5

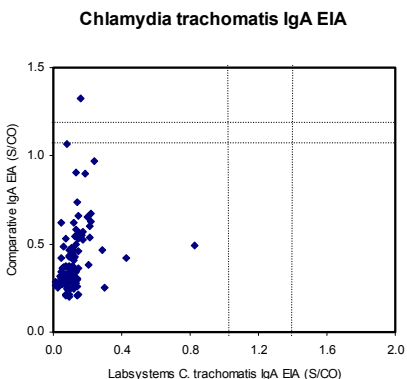
Spécificité

La spécificité des tests EIA IgG et IgA Chlamydia trachomatis d'Ani Labsystems a été comparée à un autre test commercial IgG et IgA C. trachomatis en testant des échantillons de sérum d'enfants âgés de 1 à 5 ans (n=123). Les résultats respectifs sont montrés dans les graphiques 3 et 4.

Graphique 3. Corrélation des valeurs S/CO entre le test EIA IgG C. trachomatis d'Ani Labsystems et une autre méthode utilisant des peptides.



Graphique 4. Correlation des valeurs S/CO entre le test EIA IgA C. trachomatis d'Ani Labsystems et une autre méthode utilisant des peptides.



Conclusion

Les kits IgG et IgA C. trachomatis d'Ani Labsystems offrent une sensibilité et une spécificité correctes pour le diagnostic.

RISQUES D'ERREUR

VALEUR D'ABSORBANCE DU BLANC TROP ELEVEE	
Cause/Erreur	Solution
1. Contamination, éclaboussures provenant des autres puits	Éviter toute contamination

2. La solution de lavage concentrée n'a pas été diluée correctement	Doit être diluée 1:10 (1+9)
3. Lavage insuffisant	Vérifier les performances du laveur
4. Contamination du TMB-substrat dans le bassin de réaction.	Conserver la solution de substrat restante jusqu'à la fin du test. Vérifier la couleur du substrat dans le bassin de réaction. Une coloration bleue indique une contamination

LES VALEURS D'ABSORBANCE SONT BASSES	
Cause/Erreur	Solution
1. La température d'incubation est trop basse	Incuber à 37°C (± 1°C). L'efficacité du chauffage peut varier d'un type d'incubateur à l'autre. Préférer ceux avec une production efficace et homogène de la chaleur.
2. Contamination du Conjugué avec des éclaboussures de sérum humain	Toutes les valeurs d'absorbance sont basses. Quelques nanolitres de sérum suffisent à bloquer l'activité du Conjugué. Porter une attention particulière pour éviter les contaminations
3. Contamination des puits avec des éclaboussures de sérum humain.	Quelques valeurs d'absorbance sont basses. Porter une attention particulière pour éviter les contaminations
4. Les réactifs ont été détériorés : <ul style="list-style-type: none"> à cause d'une contamination ou d'une détérioration HRP dans le Conjugué. A cause d'un mauvais stockage 	Pour éviter les contaminations et les résultats incorrects en découlant, travailler en asepsie lors du prélèvement des aliquotes dans les flacons de réactifs Protéger les réactifs d'une lumière excessive, stocker à +4°C
5. Les réactifs n'ont pas été amenés à température ambiante avant de commencer	Doivent être entre +20°C et +25°C au début du test
6. Le temps d'incubation est trop court	Incuber 1h (+/-5min) ou 30 min.
7. Inversion de réactifs	Ne pas mélanger ou interchanger les réactifs provenant de lots différents
8. La solution stop n'est pas mélangée correctement	Bien mélanger avant la lecture

VALEUR DU CONTROLE POSITIF BASSE	
Cause/Erreur	Solution
1. Le contrôle n'est pas mélangé avec le tampon d'échantillon pendant le pipetage	Après avoir déposé le contrôle, rinser le bout de la pipette avec le tampon d'échantillon

MAUVAISE PRECISION	
Cause/Erreur	Solution
1. Les pipettes ne sont pas correctement calibrées	Vérifier la calibration des pipettes
2. Mauvais lavage dû à une contamination des embouts du laveur	Nettoyer régulièrement les embouts du laveur
3. La plaque reste trop longtemps à sec après le lavage	Suivre très précisément les instructions du kit
4. La plaque n'est pas chauffée uniformément	Réparer l'incubateur ou l'incubateur/agitateur utilisé
5. L'échantillon de serum/plasma n'est pas mélangé correctement avec le tampon.	Pendant le pipetage, mélanger l'échantillon avec le tampon.
6. La solution d'arrêt n'est pas mélangée correctement.	Bien agiter avant la lecture.

LES VALEURS D'ABSORBANCE SONT ELEVEES	
Cause/Erreur	Solution
1. La température d'incubation est trop élevée	Incuber à 37°C (± 1°C). L'efficacité de chauffage peut varier d'un type d'incubateur à l'autre. Préférer ceux avec une production et une distribution homogène de la chaleur
2. Le temps d'incubation est trop long. Cela peut être le cas spécialement avec les systèmes automatiques.	Vérifier les temps d'incubation (doivent être de 30 (± 3) min, 30 (±3) min, 15 (±1) min)
3. Valeur du contrôle négatif élevée. Contamination, éclaboussures à partir d'autres puits, changement des bouchons de flacon	Eviter toute contamination

Gebrauchsanleitung

Nur zur *in vitro* Diagnostic

Chlamydia trachomatis IgG EIA

Ein Festphasen - Enzymimmunoassay zur Detektion von IgG Antikörpern gegen *Chlamydia trachomatis* in Humanserum oder Plasma.

Inhaltsverzeichnis

ANWENDUNGSBEREICH	14
EINLEITUNG	14
TESTPRINZIP	15
KIT INHALT	15
REAGENZIIEN VORBEREITUNG	15
ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	16
SAMMLUNG UND LAGERUNG DER PROBEN	16
VORSICHTSMASSNAHMEN	16
TESTDURCHFÜHRUNG	17
ERGEBNISSE	17
BEGRENZUNGEN DES TESTSYSTEMS	18
TESTCHARAKTERISTIKA	18
TROUBLE SHOOTING	20
LITERATUR	21
ANDERE PRODUKTE	22
GEBRAUCHTE SYMBOLEN	22

ANWENDUNGSBEREICH

Ani Lab systems' Chlamydia trachomatis IgG Test wurde zum Nachweis von spezifischen IgG Antikörpern gegen *Chlamydia trachomatis* im menschlichen Serum oder Plasma entwickelt.

EINLEITUNG

Chlamydia trachomatis ist eine häufige Ursache sexuell übertragener Krankheiten. Es ist die häufigste Ursache der Adnexitis (pelvic inflammatory disease PID), welches der medizinische Ausdruck für unterschiedliche Arten von Infektionen der Gebärmutter, der Eileiter und der angrenzenden Beckenregion ist. Adnexitis führt zu schweren langfristigen Folgeerkrankungen, insbesondere Unfruchtbarkeit und Extrauterinschwangerschaft. Viele Adnexitis Fälle verlaufen asymptomatisch oder zeigen minimale Symptome, können aber dennoch eine dauerhafte Eileiter- Schädigung verursachen (1). Folglich hilft Screening für Adnexitis verursachende Mikroorganismen, insbesondere *Chlamydia trachomatis*, zur Vermeidung dieser Langzeitfolgen.

Chlamydia trachomatis Infektion wird ebenfalls mit der reaktiven Arthritis assoziiert(2) .

Die exakte Diagnose einer *Chlamydia trachomatis* Infektion durch Zellkultur, Antigennachweis oder DNA/PCR ist oft aufwendig und teuer. Überstandene oder komplizierte

Infektionen sind mit den o.g. Methoden nicht immer zu erfassen.

Die alternative Methode für die klinische Diagnose ist die Messung von Antikörpern gegen *Chlamydia trachomatis* im Serum oder anderen Sekreten. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern im menschlichen Serum ist wegen der Gemeinsamkeiten der Antigenstruktur von *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae*, und der hohen Prävalenz von *Chlamydia pneumoniae* Antikörpern in der Bevölkerung schwierig. Die gemeinsame Struktur kann zu Kreuzreaktionen in serologischen Tests führen.

Der speziesspezifische *Chlamydia trachomatis* EIA Test von Ani Lab systems' basiert auf synthetisch hergestellten Peptiden aus der *C. trachomatis*-spezifischen variablen Domäne von MOMP (major outer membrane protein). Dies ermöglicht Screening und Diagnostik von *Chlamydia trachomatis* Infektionen ohne eine Interferenz von *Chlamydia pneumoniae* Antikörper (3). Für eine komplette Diagnostik von akuter und chronischer Infektion ist es wichtig beide *Chlamydia trachomatis* Antikörper IgG und IgA zu bestimmen.

Mikroimmunfluoreszenz (MIF) ist die allgemein verwendete Methode in der *C. trachomatis* Serologie. Es hat sich gezeigt, dass die Seroprävalenz Rate von Peptid-EIA vergleichbar mit den MIF Assays ist (4). EIA Tests sind aber weniger aufwendig, preiswerter und man hat die Möglichkeit einen Automaten zu benutzen.

TESTPRINZIP

Das Prinzip des Ani Lab systems Chlamydia trachomatis EIA basiert auf einem indirekten Festphasen-Enzymimmunoassay mit Meerrettich-Peroxidase als Markerenzym. Der Testablauf entspricht den folgenden Reaktionen:

Falls im Patientenserum *Chlamydia trachomatis* IgG Antikörper vorhanden sind, verbinden diese sich mit den *Chlamydia trachomatis* Peptiden, welche an die Polystyren Oberfläche der Mikrotiterstreifen gebunden sind. Überschüssige Patientenproben werden durch Waschen entfernt. Meerrettich-Peroxidase konjugiertes anti-human IgG (Schaf) wird hinzugefügt. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt und farbloses Enzymsubstrat (H₂O₂), dass das Chromogen (TMB) enthält, wird hinzugefügt. Die enzymatische Reaktion von Chromogen/Substrat führt zu einem farbigen Endprodukt. Die Enzymchromogen/ Substrat Reaktion wird mit Säure (H₂SO₄) gestoppt. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der Konzentration von *Chlamydia trachomatis* Antikörpern in der Patientenprobe.

KIT INHALT

- Die Reagenzien werden bei +2°C - +8°C aufbewahrt.
- Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente des Testkits und auf dem Außenetikett angegeben. Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden
- Vermeiden Sie direkten Lichteinfluß. Dies ist hauptsächlich zur Sicherheit. Die lichtempfindlichen

- Reagenzien sind das Konjugat und die TMB-Substratlösung. Die letztere ist zum Schutz in undurchsichtige Kunststoffgefäße abgefüllt
- Folgende Reagenzien können beliebig aus Ani Lab systems kits Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae und Bordetella pertussis IgG, IgA und IgM verschiedener Chargen-Nummern verwendet werden. Diese Lösungen können auch separat bestellt werden (siehe Produktliste):
 - Waschlösung
 - Stopplösung
 - TMB-Substratlösung

- 1 MIKROTITERPLATTE, 12 x 8 Vertiefungen
Beschichtete Mikrotiterplatte
- 2 PROBENVERDÜNNUNGSLÖSUNG, 30 ml
Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Zusätzen, einem blau gefärbten Reagenz und 0.05 % Bronidox® als Konservierungsmittel.
- 3a NEGATIVE KONTROLLE, 1 ml
Chlamydia trachomatis Antikörper negatives Human- serum mit 0.05 % Bronidox® als Konservierungsmittel.
- 3b POSITIVE KONTROLLE, 1 ml
Chlamydia trachomatis Antikörper positives Human- serum mit 0.05 % Bronidox® als Konservierungsmittel
- 4 KONJUGATE, 40 ml
Gepufferte Kochsalzlösung mit Zusätzen, einem rotgefärbten Reagenz, Meerrettich-Peroxidase konjugiertes anti-human IgG (Schaf) mit 0.1% N-Methylisothiazolone als Konservierungsmittel.
- 5 TMB-SUBSTRAT SOLUTION, gebrauchsfertig, 2 x 18 ml
Citratpuffer, enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid mit Zusätzen und 0.01 % Kathon CG als Konservierungsmittel.
- 6 STOPPLÖSUNG, 25 ml
0.45 M H₂SO₄
- 7 WASCHLÖSUNG, 100 ml
Konzentrierte citratgepufferte Kochsalzlösung mit Zusätzen und 0.05 % Bronidox® als Konservierungsmittel.

ABDECKFOLIEN für die Platten, 2 Stück

EINWEGBEHÄLTER für Reagenzien, 6 Stück

REAGENZIEN VORBEREITUNG

Reagenzien	Vorbereitung	Haltbarkeit der geöffneten / verdünnten Reagenzien(+2°C bis +8°C)
1 Beschichtete Mikrotiterplatte	Ready for use	6 Monate *)
2 Probenverdünnungslösung	Ready for use	6 Monate *)
3a Neg. Kontrolle	Ready for use	6 Monate *)
3b Pos.Kontrolle	Ready for use	6 Monate *)
4 Konjugate	Ready for use	6 Monate *)
5 TMB-Substratlösung	Ready for use	6 Monate *)
		Verwerfen Sie die

6 Stopplösung 7 Waschlösung Konzentrat (10x)	Ready for use Verdünnen Sie das Konzentrat (vial 7) 1+9 (1:10) mit dest. Wasser	restliche Lösung. Eine tiefblaue Farbe in der Substratlg. zeigt eine Kontamination an. Die Lösung muss verworfen werden. 6 Monate *) 6 Monate *)
Waschlösung		1 Monat bei +4°C od. 1 Woche bei Raumtemperatur

*) Nach dem Öffnen ist die Mikrotiterplatte-Folienverpackung dicht mit einem Entfeuchter verschlossen zu halten: Falten Sie die geöffnete Seite mehrmals und verschließen Sie diese luftdicht mittels Klebeband über die gesamte Breite. Die Stabilität der geöffneten Reagenzien bis zu Maximum kann nur bei Lagerung bei +2°C bis +8°C erreicht werden. Hohe Umgebungstemperaturen und Kontamination können die Stabilität herabsetzen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser, vorzugsweise steril.
- Meßzylinder zur Verdünnung der Reagenzien.
- Fläschchen zur Lagerung der verdünnten Reagenzien.
- Präzisionspipetten (Ein- Kanalpipette Bereich z.B. 0.5-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl und Multi-channel 50-300 µl)
- Papiertücher oder saugfähiges Papier
- Laborwecker, 60 min.
- Microplate Inkubator
- Microplate Photometer, 450 nm
- Microplate Wascher
- Natriumhypochloritlösung, (50-500 mg/l frei verfügbares Chlor) zur Desinfektion
- Einmalhandschuhe

SAMMLUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

Chlamydia trachomatis IgG und IgA EIAs können nur mit Serum- und Plasma (EDTA, Lithiumheparin) durchgeführt werden. Gepaarte Proben sollten jedoch auf die gleiche Weise gewonnen werden. Die Verwendung von Citrat- und ACD Plasma ist nicht möglich, da es aufgrund der Verdünnung des Plasmas mit dem Antikoagulant zu einer Beeinträchtigung der klinischen Interpretation kommen kann.

Serum- oder Plasmaproben sollten bei +4°C gekühlt gelagert werden. Falls der Test nicht innerhalb von einer Woche nach der Blutentnahme angesetzt werden kann, sollten die Proben tiefgefroren werden (-20° oder -70°C). **Die Proben sollten nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.**

Benutzen Sie kein Natriumazid als Konservierungsmittel, da es die Meerrettich-Peroxidase inaktiviert.

Hitze-Inaktivierung von Serum- oder Plasmaproben (+56°C, 30 Min.) kann zu unspezifischen Ergebnissen führen.

Mikrobiell kontaminierte, stark hämolytische oder hyperlipämische Seren oder Plasmen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Lange Lagerung der Seren (tiefgefroren länger als ein Jahr) kann zu Lipidaggregaten führen, welche dann ein unspezifisches Ergebnis erzeugen können.

VORSICHTSMAßNAHMEN

Nur zum *in vitro* Diagnostik Gebrauch.

Warnung: Potentiell infektiöses Material!

Jede Spendereinheit wurde auf Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus), HCV (Hepatitis C Virus) und Hepatitis B Marker (HBsAg) getestet. Die Ergebnisse waren negativ. Da kein Test und keine Inaktivierungsmethode komplette Sicherheit dafür bieten können, daß HIV, HBV, HCV oder andere infektiöse Bestandteile nicht vorhanden sind, sollten diese Reagenzien entsprechend Sicherheitsstufe 2 behandelt werden, gemäß der Empfehlung des Center for Disease Control / National Institutes for Health Manual "Bio Safety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 2007 (6).

Vernichten Sie alle Materialien und Proben wie infektiöses Material. Die beste Methode zur Vernichtung ist Autoklavieren für mindestens eine Stunde bei 121°C. Flüssiger Abfall ohne Säure und neutralisierter Abfall kann mit Natriumhypochlorit gemischt werden, so daß die Lösung insgesamt 50 - 500 mg/l freies Chlor enthält, 30 Minuten einwirken lassen. Verschüttete Reagenzien sollten mit einer jodhaltigen Desinfektionslösung oder Natriumhypochlorit entfernt werden. Tücher, die zum Entfernen solcher Reagenzien benutzt werden, sollten wie infektiöses Material behandelt werden. Wiederverwendbare Glasgefäße müssen desinfiziert und frei von Überresten des Reinigungsmittels sein.

Flüssiger, säurehaltiger Abfall muß mit Lauge neutralisiert werden, bevor Natriumhypochlorit dazugegeben wird.

Die Stopplösung (Gefäß 6) enthält 0,45 M Schwefelsäure. Vermeiden Sie kontakt mit Haut und Augen.

Tragen Sie Einmalhandschuhe beim Arbeiten mit den Proben und den Reagenzien. Waschen Sie sich anschließend sorgfältig die Hände. Pipettieren Sie **nie** mit dem Mund!

Verwenden Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen-Nummern in einem Testansatz, ausser der Waschlösung, der Stopplösung und der TMB-Substratlösung. Die Verschlüsse der Fläschchen dürfen nicht vertauscht werden.

Nach Beginn des Tests sollten alle Schritte nacheinander ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Lassen Sie die Vertiefungen nach Beginn des Testes nie austrocknen

Benutzen Sie einen Teststreifen der Mikrotiterplatte nie zweimal, auch wenn einige Vertiefungen unbenutzt sind.

Präzises Pipettieren und striktes Einhalten der Inkubationszeiten und -temperaturen sind erforderlich

TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitungen

- **Bringen Sie die Reagenzien und die Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur (+20°C to +25°C) bevor Sie mit dem Testansatz beginnen.**
- Regulieren Sie den Inkubator auf +37°C.
- Hinweis: Wenn Sie einen Automaten benutzen, überprüfen Sie bitte, dass die tatsächlichen Inkubationszeiten nicht zu lang sind.

SCHRITT I

- Pipettieren Sie 180 µl Probenverdünnungslösung (Gefäß 2) in jede Vertiefung.²
- Pipettieren Sie 20 µl Probenverdünnungslösung für den Leerwert, 20 µl Proben, 20 µl der Negativ – Kontrolle (Gefäß 3a), und 20 µl der Positiv-Kontrolle (Gefäß 3b). Gut vermischen¹
- Kleben Sie die Streifen mit der Folie ab und inkubieren Sie für 30 (± 3) Min. bei 37°(±1 °C).
- Waschen Sie **5 x 400 µl/** Vertiefung³

SCHRITT II

- Pipettieren Sie 200 µl Konjugat (Gefäß 4) in jede Vertiefung.
- Kleben Sie die Streifen mit Plastikfolie ab und inkubieren Sie 30 (± 3) Minuten bei +37°C (±1 °C).
- Waschen Sie **5 x 400 µl/** Vertiefung³

SCHRITT III

- Pipettieren Sie 200 µl TMB-Substratlösung (Gefäß 5) in jede Vertiefung.
- Inkubieren Sie 15 (±1) Minuten bei Raumtemperatur (+20-25 °C) im Dunkeln.

SCHRITT IV

- Stoppen Sie die der Enzym-Substrat-Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (Gefäß 6) in jede Vertiefung⁴
- Messen Sie die Absorption sofort bei 450 nm / Referenz 620 nm (590 – 690 nm).⁵

Hinweise

Es wird empfohlen, für mehr Effizienz und Präzision eine 8-Kanal-Pipette zu verwenden.

1. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen besonders für die Positiv-Kontrolle anzuwenden. Nach dem Vorlegen der Probenverdünnungslösung in die Vertiefungen erst die Proben und dann die Kontrollen pipettieren Benutzen Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze. Gut vermischen: Die Pipettenspitze in die Probenverdünnungslösung tauchen und die Proben /Kontrollen vorsichtig während des Pipettierens mischen. Nicht die Wände der Vertiefungen mit der Pipettenspitze während des Mischens berühren

2. **Kontamination vermeiden.** Bei Entnahme von Reagenzien aus den Gefäßen pipettieren Sie möglichst steril zur Vermeidung von Kontaminationen. Um Kontaminationen des Konjugats zu vermeiden, füllen Sie die benötigte Menge Konjugat in einen Einweg-Reagenzbehälter. **Verwerfen Sie nach Gebrauch die**

restliche Konjugatlösung, füllen Sie sie nicht ins Gefäß zurück. Hierfür enthält der Kit 6 Einweg-Reagenzbehälter. Die Behälter können auch für die TMB-Substratlösung und Probenverdünnungslösung verwendet werden. Achten Sie darauf, die Vertiefungen während des Pipettierens der TMB-Substratlösung nicht zu berühren.

3. Das Waschen kann manuell oder mit einem Waschautomaten erfolgen. Es wird empfohlen, für 15 – 30 Sekunden die Waschlösung in den Vertiefungen während jedes Waschvorgangs zu inkubieren. Nach dem Waschen entfernen Sie die Restflüssigkeit durch Aufklopfen der Mikrotitrationsplatte auf saugfähigem Papier.

4. Nach Zugabe der Stopplösung verändert sich bei positiven Reaktionen die Farbe von blau nach gelb. Eine Grünfärbung ist ein Indikator dafür, dass die Stopplösung nicht gut in den Vertiefungen vermischt wurde. Falls notwendig, mischen Sie die Vertiefungen vor der Messung.

5. Der Leerwert sollte gemessen werden, um nachzuprüfen, ob dessen Absorption innerhalb der Grenzen der Kontrollwerte liegt

ERGEBNISSE

Qualitätskontrolle

Stellen Sie vor Berechnung der Ergebnisse sicher, dass die Absorptionswerte von Reagenzienleerwert und Kontrollen innerhalb der vorgegebenen Qualitätskontrollbereiche liegen. Sollten die Absorptionswerte von Reagenzienleerwert und Kontrolle nicht in den vorgegebenen Bereichen liegen, so sind die Ergebnisse ungültig. Der Test muss wiederholt werden.

Qualitätskontrollbereiche

QC Probe	Zu erwartender Absorptionswert bei 450 nm
Reagenzienleerwert	< 0.10
Negativ Kontrolle NC	< 0.20 *)
Positiv Kontrolle PC	0.70 < PC ≤ 2.00 *)

*) = nach Subtraktion der Absorption des Reagenzienleerwertes.

Berechnung der Ergebnisse

Abkürzungen:

Arb = Mittelwert der Absorption des Reagenzienleerwertes
 Apc = Mittelwert der Absorption der Positiv Kontrolle
 As = Mittelwert der Absorption der Proben
 CO = Cut-off Wert in Absorptions units

Verwenden Sie die folgenden Formeln zur Berechnung des **CO** (Cut-off) und **S/CO** (Signal /Cut-off) Werte:

$$\text{CO} = 0.6 \times (\text{Apc} - \text{Arb})$$

$$\text{S/CO} = (\text{As} - \text{Arb}) / \text{CO}$$

Beispiel:

Probe	Mittelwert A bei 450 nm
Reagenzienleerwert	0.030
Positive Kontrolle	1.370
Probe 1	1.520

$$CO = 0.6 \times (1.370 - 0.030) = 0.804$$

$$S/CO (\text{Sample 1}) = (1.520 - 0.030) / 0.804 = 1.85$$

Interpretation der Ergebnisse

S/CO < 1.0 Negativ.

Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass die getestete Probe entweder keine IgG-Antikörper gegen *Chlamydia trachomatis* enthält oder dass die Antikörpermenge noch unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Probe könnte auch bereits IgA-Antikörper gegen *Chlamydia trachomatis* enthalten.

1.0 ≤ S/CO < 1.4 Zweifelhafte.

Die Anwesenheit von *Chlamydia trachomatis* IgG Antikörpern kann nicht eindeutig nachgewiesen werden. Im Falle eines klinischen Verdachtes, erneute Testung der Antikörper nach 2 Wochen durchführen.

S/CO ≥ 1.4 Positiv.

Ein positives Ergebnis zeigt die Anwesenheit von *Chlamydia trachomatis* IgG Antikörpern in der Probe, die ein Hinweis auf eine zurückliegende oder bestehende Infektion sein können.

BEGRENZUNG DES TESTSYSTEMS

Da keine einzige Methode zu einer definierten Diagnose führen kann, sollten die Ergebnisse immer im Zusammenhang mit der Klinik und anderen Labormethoden interpretiert werden.

Der Test sollte von ausgebildeten Labortechnikern durchgeführt werden

TESTCHARAKTERISTIKA

Reproduzierbarkeit

Tabelle 1. Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testansatzes

C. trachomatis IgG Probe Nr	Wiederholungen	Absorptions-MW	SD	CV %
1	24	0.993	0.048	4.8
2	24	1.251	0.061	4.9
3	24	1.694	0.098	5.8

Tabelle 2. Reproduzierbarkeit in verschiedenen Testansätzen

C. trachomatis IgG sample no	Wiederholungen	Testläufe	Absorptions-MW	S/CO-MW	SD S/CO	CV %
1	4	10	1.053	1.14	0.06	4.9
2	4	10	1.286	1.39	0.06	4.0
3	4	10	1.375	1.49	0.07	4.6
4	4	10	1.739	1.88	0.07	3.9

Zusammenfassung der Evaluierungsstudie
Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität der Ani Labsystems' species-spezifischen *Chlamydia trachomatis* IgG und IgA EIAs wurde mit derjenigen eines anderen kommerziell erhältlichen *Chlamydia trachomatis* IgG und IgA Assays anhand von Serumproben (n=56) mit klinisch abgesicherter Pelvic Inflammatory Disease (PID) verglichen.

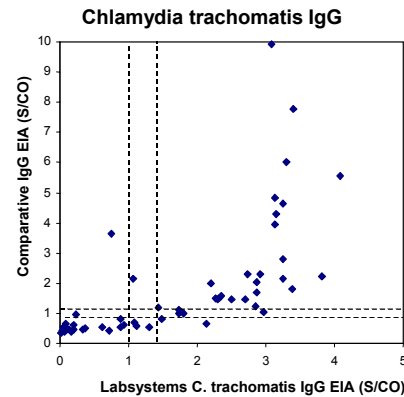


Abb. 1. Korrelation der S/CO Werte zwischen dem Ani Labsystems C. trachomatis IgG EIA und einem anderen Peptid-EIA.

Tabelle 3. Übereinstimmung der Interpretation zwischen dem Ani Labsystems C. trachomatis IgG EIA und einem anderen Peptid-EIA.

IgG		Labsystems	
		Pos	Neg
Comparative	Pos	24	2
	Neg	6	24

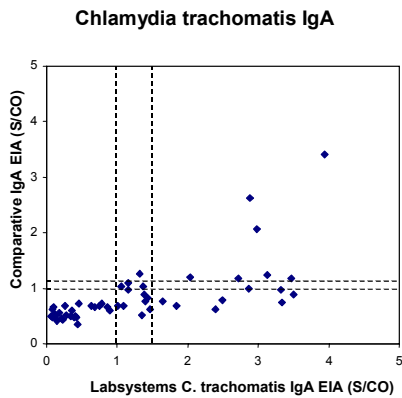


Abb. 2. Korrelation der S/CO Werte zwischen dem Ani Lab systems C. trachomatis IgA EIA und einem anderen Peptid-EIA

Tabelle 4. Übereinstimmung der Interpretation zwischen dem Ani Lab systems C. trachomatis IgG EIA und einem anderen Peptid –EIA.

IgA		Labsystems	
		Pos	Neg
Comparative	Pos	9	2
	Neg	11	34

Die diagnostische Sensitivität der Ani Lab systems' Chlamydia trachomatis IgG und IgA EIAs wurde zusammen mit einem anderen kommerziell erhältlichen C.trachomatis IgG und IgA EIA in einer Studie von Verkooyen und seiner Gruppe (5) evaluiert. Es wurden Patientenserum mit einer in der PCR nachgewiesenen Chlamydia trachomatis Infektion getestet, als auch eine Gruppe Blutspender als negative Kontrollgruppe.

In der Gruppe der Patienten, mit PCR-nachgewiesener Chlamydia trachomatis Infektion, zeigten über 70 % eine positive IgG und weniger als 50 % eine positive IgA Antwort (Table 5).

In der Studie hatten weniger als 100 % der PCR-positiven Proben C. trachomatis Antikörper. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Immunsystem nicht genügend Zeit für eine Immunantwort hatte.

Tabelle 5. Die Prävalenz von Chlamydia trachomatis IgG und IgA Antikörper mittels Peptid-EIAs von Ani Lab systems und eines anderen kommerziellen Herstellers (5)

	Patienten mit PCR-bestätigter aktiver C. trachomatis Infektion, n=324	Blutspender , n=443
	C.tra IgG positive (%)	
Ani Lab systems EIA	69	6
Vergleichs-EIA	68	6
	C.tra IgA positive (%)	
Ani Lab systems EIA	38	5
Vergleichs-EIA	48	5

Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität der Ani Lab systems species-spezifischen Chlamydia trachomatis IgG und IgA EIAs wurde durch Untersuchung von Seren ein- bis fünfjähriger Kinder im Vergleich zu einem anderen kommerziell erhältlichen C. trachomatis IgG und IgA Assay ermittelt(n=123). Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

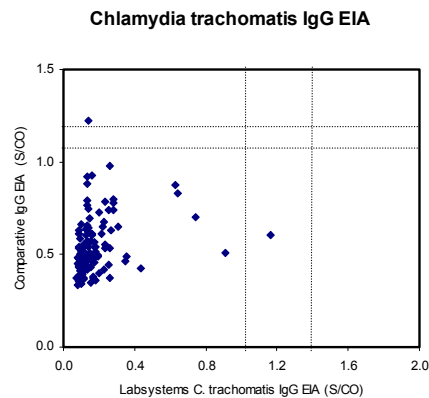


Abb. 3. Korrelation der S/CO Werte zwischen C. trachomatis IgG EIA von Ani Lab systems und einem anderen Peptide-EIA.

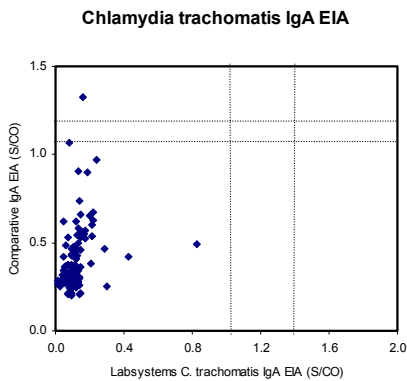


Abb. 4. Korrelation der S/CO Werte zwischen C. trachomatis IgA EIA von Ani Labsystems und einem anderen Peptide-EIA.

Schlussfolgerung

Die Ani Labsystems C. trachomatis IgG und IgA Kits zeigen eine gute diagnostische Sensitivität und Spezifität.

TROUBLE SHOOTING

LEERWERT IST ZU HOCH

Ursache / Fehler	Lösung
1. Kontamination durch Spritzer von anderen Vertiefungen.	Vermeiden Sie Kontaminationen.
2. Das Waschlösungskonzentrat wurde nicht korrekt verdünnt.	Verdünnen Sie die Waschlösung im Verhältnis 1:10 (1+9)
3. Nicht ausreichendes Waschen.	Überprüfen Sie Ihren Washer.
4. Kontamination des Reaktionsgefäßes für das TMB-substrat	Heben Sie die restliche TMB-substratlösung bis zum Testende auf. Prüfen Sie, ob sich die Lösung im Gefäß blau färbt. Dies ist ein Hinweis auf eine Kontamination.

Ursache/Fehler	Lösung
ABSORPTIONSWERTE SIND NIEDRIG	
1. Inkubationstemperatur ist zu niedrig	Inkubieren Sie bei 37°C ±1°C. Verschiedene Geräte heizen unterschiedlich gut. Inkubatoren, die effizient und gleichmäßig wärmen, sind vorzuziehen.
2. Kontamination von Konjugat mit Spritzern von Humanserum	Alle Absorptionswerte sind niedrig. Bereits geringe Serummengen im Nanoliterbereich genügen, um die Aktivität des Konjugats zu blockieren. Achten Sie besonders darauf, Kontaminationen zu vermeiden.

3. Kontamination von Vertiefungen mit Spritzern von Humanserum	Vereinzelte Absorptionswerte sind (sehr) niedrig. Achten Sie besonders darauf, Kontaminationen zu vermeiden.
4. Reagenzien sind abgebaut * durch Kontamination oder HRP Abbau des Konjugats * durch unsachgemäße Lagerung	Aliquot nur unter sterilen Bedingungen aus den Reagenzgefäßen entnehmen, um Kontaminationen zu vermeiden, ansonsten können fehlerhaft Resultate auftreten. Reagenzien von Lichteinfall schützen. Lagern Sie die Reagenzien bei + 4 °C.
5. Reagenzien wurden vor dem Testansatz nicht auf Raumtemperatur erwärmt.	Die Reagenzien sollten vor dem Testansatz auf +20°C bis +25°C erwärmt werden.
6. Inkubationszeit ist zu kurz	1 Stunde ± 5 Min oder 30 Min inkubieren.
7. Austausch von Reagenzien aus verschiedenen Chargen	Verwenden Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen in einem Testansatz.
8. Nach Zugabe der Stopplösung wurde nicht ausreichend gemischt	Mischen Sie sorgfältig nach Zugabe der Stopplösung.

POSITIVE KONTROLLE HAT ZU NIEDRIGE ABSORPTIONSWERTE

Ursache/Fehler	Lösung
1. Die Kontrolle wurde während des Pipettierens nicht ausreichend mit dem Probenverdünnungspuffer vermischt.	Vermischen Sie die Kontrolle gründlich mit der Probenverdünnungslösung in der Vertiefung.

GERINGE PRÄZISION

Ursache / Fehler	Lösung
1. Die Pipetten sind schlecht kalibriert.	Überprüfen Sie die Kalibrierung der Pipetten.
2. Uneffizientes Waschen durch Kontamination des Waschtopfes.	Reinigen Sie die Zähne des Waschkamms regelmäßig.
3. Die Platte trocknet aus durch nicht zügiges Weiterarbeiten nach dem Waschen.	Befolgen Sie strikt die Testanweisung in der Gebrauchsanleitung.
4. Die Mikrotitrationsplatte wird unregelmäßig erwärmt.	Wartung des verwendeten Inkubators oder Brutschanks.
5. Die Patientenprobe wurde nicht ausreichend mit Probenverdünnungspuffer vermischt	Vermischen Sie die Proben während des Pipettierens ausreichend mit dem Probenverdünnungspuffer in der Vertiefung
6. Nach Zugabe der Stopplösung wurde nicht ausreichend gemischt	Mischen Sie sorgfältig nach Zugabe der Stopplösung und vor der Messung.

ZU HOHE ABSORPTIONSWERTE	
Usache/Fehler	Lösung
1. Inkubationstemperatur ist zu hoch	Inkubieren Sie bei 37°C mit einer Toleranz von $\pm 1^\circ\text{C}$. Inkubatoren mit effizienter und gleichmäßiger Erwärmung sind zu bevorzugen.
2. Inkubationszeit ist zu lang. Dies kann häufig der Fall, wenn Sie automatisiert arbeiten.	Kontrollieren Sie die wahre Inkubationszeit (30 (± 3) Min, 30 (± 3) Min., 15 (± 1) Min).
3. Negative Kontrolle hat zu hohe Absorbtionswerte: Kontaminationen, durch Spritzer aus anderen Vertiefungen, Vertausch der Verschlusskappen.	Vermeiden Sie Kontaminationen.

REFERENCES / LITERATUR /LITERATUR

1. Paavonen J.(1998). Pelvic inflammatory disease. From diagnosis to prevention. *Dermatologic Clinics* 16:747-756

2. Nikkari S, Puolakkainen M, Närvänen A, Aakre O, Toivanen P, Leirisalo-Repo M (2001). Use of Peptide Based Enzyme Immunoassay in Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Triggered Reactive Arthritis. *J Rheumatol* 28:2487-2493 .

3. Närvänen A, Puolakkainen M, Wu H, Kino K, Suni J. (1997). Detection of Antibodies to *Chlamydia trachomatis* with Peptide-Based Species-Specific Enzyme Immunoassay. *Inf. Dis. Obst. Gyn.* 5: 349-354.

4. Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJLM, van den Brule AJC. (2002). Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies . *J.Clin. Microbiol.* 40:584-587.

5. Verkooyen RP, Peeters MF, van Rijsoort-Vos JH, van der Meijden WI, Mouton JW (2002). Sensitivity and specificity of three new commercially available *Chlamydia trachomatis* tests. *Int. J. STD AIDS* 13 (Suppl.2)23-25.

6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 5th Edition 2007. US Government Printing Office. Washington 2007

RELATED PRODUCTS / PRODUITS AFFILIÉS / ANDERE PRODUKTE

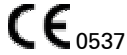
Product number	Description	Size
6111 300	Chlamydia pneumoniae IgG EIA	96 wells
6111 310	Chlamydia pneumoniae IgA EIA	96 wells
6111 320	Chlamydia pneumoniae IgM EIA	96 wells
6111 101	Chlamydia trachomatis IgG EIA	96 wells
6111 111	Chlamydia trachomatis IgA EIA	96 wells
6111 400	Mycoplasma pneumoniae IgG EIA	96 wells
6111 410	Mycoplasma pneumoniae IgA EIA	96 wells
6111 420	Mycoplasma pneumoniae IgM EIA	96 wells
6111 500	Bordetella pertussis IgG EIA	96 wells
6111 510	Bordetella pertussis IgA EIA	96 wells
6111 520	Bordetella pertussis IgM EIA	96 wells
6111 045	Washing solution	100 ml
6111 055	TMB-substrate solution	18 ml
6111 060	Stopping solution, 0,45 M H ₂ SO ₄	25 ml
6108 380	C. pneumoniae IgG/IgM MIFA	20x21 w.
6108 382	C. pneumoniae IgG/IgM MIFA	20x12 w.
6108 390	C. pneumoniae IgA MIFA	20x21 w.
6108 392	C. pneumoniae IgA MIFA	20x12 w.
6108 384	C. pneumoniae MIFA slides	5x21 wells

SYMBOLS USED / SYMBOLES UTILISÉS / SIMBOLOS UTILIZADOS / GEBRAUCHTE SYMBOLEN / SIMBOLI USATI

Products / Produits / Productos / Produkte / Prodotto	
6111 300	Chlamydia pneumoniae IgG EIA
6111 310	Chlamydia pneumoniae IgA EIA
6111 320	Chlamydia pneumoniae IgM EIA
6111 400	Mycoplasma pneumoniae IgG EIA
6111 410	Mycoplasma pneumoniae IgA EIA
6111 420	Mycoplasma pneumoniae IgM EIA
6111 500	Bordetella pertussis IgG EIA
6111 510	Bordetella pertussis IgA EIA
6111 520	Bordetella pertussis IgM EIA
6111 101	Chlamydia Trachomatis IgG EIA
6111 111	Chlamydia Trachomatis IgA EIA
6111 045	Washing solution
6111 055	TMB-substrate solution
6111 060	Stopping solution, 0,45 M H ₂ SO ₄



CE-mark
CE-mark
Markado CE
CE-Kennenzeicheh
Marchio CE



CE-mark, code of the Notified Body
CE-mark, code des autorités compétentes
Markado CE, no. del organismo notificado
CE-Kennenzeicheh, Kennnummer der benannten Stelle
Marchio CE, codice delle autorità competenti



Catalog number
Ref. no
No. de catálogo
Bestellnr.
Cat.n.



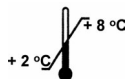
Contains sufficient for < n > tests
Pour n dosages
Para n determinaciones
Für n Bestimmungen
Per n determinazioni



Use by YYYY-MM
A utiliser avant YYYY-MM
Utilizado por YYYY-MM
Verwendbar bis YYYY-MM
Utilizzarre entro



Batch code
Lot no.
No de lote
Chargenbezeichnung
Lotto N.



Temperature limitation
Limites de température
Limite de temperature
Temperaturgrenzen
Limiti di temperatura



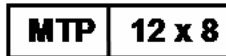
In vitro diagnostic medical device
Diagnostic in vitro
Diagnóstico in vitro
In-vitro-Diagnostikum
Diagnostico in vitro



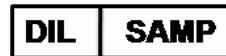
Manufacturer
Fabricant
Fabricante
Hersteller
Fabbricante



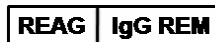
Consult instructions for use
Lire la notice d'utilisation
Consultar manual de instrucciones
Gebrauchsanweisung beachten
Consultare il manuale di istruzioni



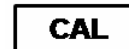
Coated microplate
Microplaque marqué
Microplaca sensibilizada
Beschichtete Microtiterplatte
Micropiastra sensibilizzata



Sample diluent
Diluant pour échantillon
Diluyente de la muestra
Probenverdünnungslösung
Diluyente per i campioni



IgG removing reagent
Solution de traitement des IgG
Reagente extractor de IgG
IgG Absorptioreagenz
Reattivo de bloqueo dello IgG



Calibrator
Etalon
Calibrador
Kalibrator
Calibratore

CONTROL CO

Cut-Off control
 Contrôle de Cut-Off
 Control de corte
 Cut-Off Kontrolle
 Controllo Cut-Off

CONTROL BORD

Borderline control
 Contrôle Intermédiaire
 Control intermedio
 Grenzwert Kontrolle
 Controllo Mezzo

CONTROL +

Positive control
 Contrôle Positif
 Control positivo
 Positiv Kontrolle
 Controllo positivo

CONTROL -

Negative control
 Contrôle négatif
 Control negativo
 Negativ Kontrolle
 Controllo negativo

CONJ IgG

Conjugate IgG
 Conjugué IgG
 Conjugado IgG
 Konjugat IgG
 Conjugato IgG

CONJ IgA

Conjugate IgA
 Conjugué IgA
 Conjugado IgA
 Konjugat IgA
 Conjugato IgA

CONJ IgM

Conjugate IgM
 Conjugué IgM
 Conjugado IgM
 Konjugat IgM
 Conjugato IgM

SUBS TMB

TMB-Substrate (ready to use)
 TMB-Substrat (prêt à l'emploi)
 TMB-Substratlösung (gebrauchsfertig)
 Sustrato-TMB (préstamo para utilizar)
 TMD-substrato (prestito per usare)

SOLN STOP

Stopping solution (0.45 M H₂SO₄)
 Solution Stop. (0.45 M H₂SO₄)
 Stopplösung (0.45 M H₂SO₄)
 Solución de parada (0.45 M H₂SO₄)
 Soluzione Stop (0.45 M H₂SO₄)

BUF WASH 10X

Washing solution (concentrate)
 Solution de lavage (concentré)
 Waschlösung (Konzentrat)
 Solución de lavado (concentrado)
 Soluzione di lavaggio (concentrato)

REAG BASS

Reagent basins
 Bassins pour réactifs
 Recipientes para los reagents
 Einweg-Reagenzbehälter
 Vaschette monouso per reagenti

PLAS COV

Incubation covers
 Couvercles d'incubation
 Cubiertas de incubación
 Inkubationsabdeckungen
 Pellicola adesiva per incubazione



Potential biohazardous material.
 Matériel à risque infectieux potentiel.
 Riesgo biológico potencial
 Potentiell infektiöses Material
 Materiale biologico potenzialmente pericoloso