



SeroCP™ IgM

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for påvisning av spesifikke IgM antistoffer mot *Chlamydia pneumoniae* i humant serum

Instruksjonshåndbok

Testsett for 96 påvisninger

(Kat. Nr. A192-01M)

Testsett for 192 påvisninger

(Kat. Nr. B192-01M)

For In Vitro Diagnostisk bruk Oppbevares ved 2-8°C. **Må ikke fryses**



Savyon Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

påvisningsmetoder. Derfor brukes serologisk testing rutinemessig og tjener som et ikke-invasivt verktøy i identifikasjonen av både distale og kroniske klamydiske infeksjoner (3), hvor direkte påvisningsmetoder sjeldent er effektive (4). I tillegg kan nærværet av enkelte antistofftyper også indikere sykdommens tilstand. Primær klamydisk infeksjon karakteriseres av en dominant IgM respons innen 2 til 4 uker og en forsinket IgG og IgA respons innen 6 til 8 uker. Etter akutt *C. pneumoniae* infeksjon, går vanligvis IgM antistoffer tapt innen 2 til 6 måneder (5), IgG antistoff-titervæsker minsker vanligvis sakte; mens IgA antistoffer har en tendens til å forsvinne raskt (6). Når primær klamydisk infeksjon er mistenkt, er påvisningen av IgM høyt diagnostisk (7). Men ved tilbakevendende eller kroniske infeksjoner er forekomsten av IgM lav og fraværet av IgM ekskluderer derfor nødvendigvis ikke pågående infeksjon. Ved reinfeksjon stiger IgG- og IgA-nivåene raskt, ofte på en til to uker (8).

IgA-antistoffer har vist seg å være en pålitelig immunologisk markør på primære, kroniske og tilbakevendende infeksjoner. Disse antistoffene synker vanligvis raskt til grunnlinjenivåer etter behandling og utrydning av klamydia-infeksjonene (3). Vedholdenheten av hevede IgA antistofftitervæsker er generelt sett på som et tegn på kronisk infeksjon (6). IgG-antistoffer vedvarer for lange perioder og synker svært sakte. Derfor er nærværet av IgG-antistoffer i hovedsak indikasjon på en klamydia-infeksjon på en ubestemt tid. Imidlertid kan en firedobbel økning i IgG eller høye nivåer av IgG-antistoffer indikere en pågående kronisk infeksjon.

SeroCP™ er en ELISA-basert analyse hvor rensede elementære deler av *C. pneumoniae* (TWAR-183) brukes som antigener for å påvise antistoff-responsen i mennesker. For fullstendig diagnose av eksisterende, kroniske eller tidligere infeksjoner, anbefales det å avgjøre IgG, IgM og IgA antistoffer mot *C. pneumoniae*.

Tiltenkt bruk

SeroCP™ IgM sett er tiltenkt for påvisningen av IgM antistoffer spesifikt mot *Chlamydia pneumoniae* i humant serum.

SeroCP™ IgM sett er en kvalitativ enzym-tilknyttet immunosorbent analyse (Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA)), som brukes som et hjelpemiddel i diagnosen av *Chlamydia pneumoniae* infeksjon.

For **In Vitro** diagnostisk bruk.

Introduksjon

Chlamydia pneumoniae (TWAR) er en fremvoksende smittebærer med et spektrum av kliniske utslag, inkludert øvre og nedre luftveisinfeksjon (1). Hoveddelen av *C. pneumoniae*-infeksjoner er milde og asymptomatiske, men kan føre til alvorlige sykdommer, som faryngitt, sinusitt, akutt bronkitt og luftsmittet lungebetennelse. Uoppdaget og ubehandlet infeksjon kan føre til langvarig og vedvarende sykdom. Ferske data indikerer en mulig forbindelse mellom *C. pneumoniae* infeksjon og kroniske sykdommer (2).

Seroprevalens av *C. pneumoniae* blant barn er lav, øker raskt til middelalder, og forblir høy i alderdom (>50%).

Vanskeligheter med prøveinnhenting og utlignelighet av det infiserte området påvirker alvorlig nyttheten i direkte

Testens prinsipp

- SeroCP™ plater leveres dekket med rensede elementære deler av *C. pneumoniae* (TWAR 183) antigener.
- Serumet som skal testes fortynnes og inkuberes i SeroCP™ platen i 1 time ved 37°C. I dette steget blir *C. pneumoniae* antistoffer bundet til de immobiliserte antigener.
- Ikke-spesifikke antistoffer fjernes ved vasking.
- Anti-humant IgM konjugert til HRP (Horseradish Peroxidase) tilsettes og inkuberes i 1 time ved 37°C. I dette steget blir HRP-konjugat bundet til det forhåndsbundne antigen-antistoff komplekset.
- Ubundet konjugat fjernes ved vasking.
- Ved tilsettelsen av TMB-substrat blir substratet hydrolysert av peroxidasen, noe som gir en blå oppløsning av det reduserte substratet.
- Ved tilsettelsen av stopp-løsningen, blir den blå fargen gul og bør leses av på en ELISA-leser ved en bølgelengde på 450nm.
- Absorpsjonen er proposjonal til mengden av spesifikke antistoffer som er bundet til de belagte antigenene.

Analyseprosedyre

Tilsett 2x50µl med negativ kontroll, 1x50µl med positiv kontroll og 1/105 fortynnete prøver til mikrotiterplate-brønner dekket med C. pneumoniae antigener
↓
Dekk platen og inkuber i 1 time på 37°C ved 100% fuktighet
↓
Vask 3 ganger med vaskebuffer (300-350µl)
↓
Tilsett 50µl med 1/300 fortynnet HRP konjugat
↓
Dekk platen og inkuber i 1 time ved 37°C ved 100% fuktighet
↓
Vask 3 ganger med vaskebuffer (300-350µl)
↓
Tilsett 100µl med TMB-Substrat
↓
Dekk platen og inkuber i 15 minutter ved romtemperatur
↓
Tilsett 100µl med stoppløsning
↓
Les absorpsjon ved 450nm
↓
Beregn og tolk resultater

Innhold i settet

Testsett for 96 påvisninger Kat. nr. A192-01M

- C.pneumoniae antigen-dekket mikrotiterplate:** 96 adskillbare brønner (8x12) dekket med C.pneumoniae antigener, pakket i en aluminiumspose med et tørkemiddelkort.
1 plate
- konsentrert vaskebuffer (20X):** Et PBS - Tween buffer
1 flaske, 100ml
- serumfortynner (rød):** En klar til bruk anti-humant IgG buffer-løsning. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin som et konserveringsmiddel.
1 flaske, 60ml
- konjugatfortynner (grønn):** En klar til bruk buffer-løsning. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin som et konserveringsmiddel.
1 flaske, 40ml
- negativ kontroll:** Et klart til bruk C.pneumoniae IgM negativt humant serum. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin og mindre enn 0.1% natriumazid som konserveringsmidler.
1 ampulle, 2,5ml
- positiv kontroll:** Et klart til bruk C.pneumoniae IgM positivt humant serum. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin og mindre enn 0.1% natriumazid som konserveringsmidler.
1 ampulle, 2ml
- konsentrert HRP-konjugat (300X):** HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugert anti-humant IgM (miu kjede-spesifikt). Inneholder mindre enn 0.05% Proclin som et konserveringsmiddel.
1 ampulle, 0,2ml

- TMB-substrat:** En klar til bruk løsning. Inneholder 3, 3', 5, 5' – tetrametyl-benzidin som et kromogen og peroksid som et substrat.
1 flaske, 14ml

- stoppløsning:** En klar til bruk løsning. Inneholder 1M H₂SO₄.
1 flaske, 15ml

- Platedeksel:** **1 enhet**

- Instruksjonsmanual:** **1**

Testsett for 192 påvisninger Kat. nr. B192-01M

- C. pneumoniae antigen-dekket mikrotiter-plate:** 96 adskillbare brønner (8x12) dekket med C.pneumoniae antigener, pakket i en aluminiumspose med et tørkemiddelkort.
2 plater
- konsentrert vaskebuffer (20X):** Et PBS - Tween buffer
2 flasker, 100ml
- serumfortynner (rød):** En klar til bruk anti-humant IgG buffer-løsning. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin som et konserveringsmiddel.
2 flasker, 60ml
- konjugatfortynner (grønn):** En klar til bruk buffer-løsning. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin som et konserveringsmiddel.
1 flaske, 80ml
- negativ kontroll:** Et klart til bruk C.pneumoniae IgM negativt humant serum. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin og mindre enn 0.1% natriumazid som konserveringsmidler.
1 ampulle, 2,4ml
- positiv kontroll:** Et klart for bruk C. pneumoniae IgM positivt humant serum. Inneholder mindre enn 0.05% Proclin og mindre enn 0.1% natriumazid som konserveringsmidler.
1 ampulle, 1,25ml
- konsentrert HRP-konjugat (300X):** HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugert anti-humant IgM (miu kjede-spesifikt). Inneholder mindre enn 0.05% Proclin som et konserveringsmiddel.
1 ampulle, 0,2ml
- TMB-substrat:** En klar til bruk løsning. Inneholder 3, 3', 5, 5' – tetrametyl-benzidin som et kromogen og peroksid som et substrat.
1 flaske, 24ml
- stoppløsning:** En klar til bruk løsning. Inneholder 1M H₂SO₄.
1 flaske, 30ml
- Platedeksel:** **2 enheter**
- Instruksjonsmanual:** **1**

Nødvendige materialer som ikke medfølger

- Rene prøverør for fortynning av pasientserum.
- Engangs plastampulle for fortynning av konsentrert HRP-konjugat.
- Justerbare mikropipetter og flerkanalspipetter (5-50, 50-200 og 200-1000µl områder) og engangsspisser.

4. En liters volumetrisk flaske.
5. En 50ml volumetrisk sylinder.
6. Vaskeflaske.
7. Trekkpapir.
8. Virvelmikser
9. Et 37°C vannbad med lokk, eller et fuktighetskammer plassert i en 37°C inkubator.
10. ELISA-leser med 450nm filter.
11. Destillert eller dobbelt avionisert vann.

Advarsler og forholdsregler

1. Dette settet inneholder humant serum, som har blitt testet med FDA- og CE-godkjente teknikker, og funnet negative for HBV antigen og for HCV og HIV 1 og 2 antistoffer. Siden ingen kjent metode kan gi fullstendig forsikring om at produkter avledet fra humant blod ikke overfører infeksjon, må alle humane blod-komponenter som leveres med dette settet behandlet som potensielt smittsomt serum eller blod i henhold til anbefalingene publisert i CDC/NIH-manualen "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988.
2. TMB-substrat-løsning er et irriterende material for hud og slimhinner. Unngå direkte kontakt.
3. Alle komponentene i dette settet har blitt kalibrert og testet etter parti. Det anbefales ikke å blande komponenter fra forskjellige partier siden dette kan påvirke resultatene.
4. Fortynnet svovelsyre (1M H₂SO₄) er et irriterende middel for øyne og hud. Ved kontakt med øyne, skylk øyeblikkelig området med vann og konsulter en lege.

Lagring og lagringstid for reagensmidler

1. Alle medfølgende reagensmidler bør lagres ved 2-8°C. Uåpnede reagensampuller er stabile inntil utløpsdatoen indikert på settemballasjen. Utsetting av originalt plomberte eller forseglede komponenter for omgivende temperatur for noen timer vil ikke føre til skade på reagensmidlene. **MÅ IKKE FRYSES!**
2. Når settet er åpnet, er dets lagringstid 90 dager.
3. Ubrukte remser må forsegles i aluminiumsposen med tørkemiddelkortet, ved å rulle den åpne enden og forsegle den tett med tape over hele åpningens lengde.
4. Krystaller kan formes i den 20x konsentrerte vaskebufferen under kjølelagring, dette er helt normalt. Løs opp krystallene ved å varme bufferen til 37°C før fortynning. Når den er fortynnet, kan løsningen lagres ved 2-8°C i opptil tjueen dager.

Seruminnhenting

Forbered serum fra sterilt innhentede prøver ved hjelp av standard teknikker. Varme-inaktivert serum bør ikke brukes. Bruk av lipemisk, grumset eller forurenset serum anbefales ikke. Partikkelmateriale og bunnfall i serum kan føre til feilaktige resultater. Slike prøver bør oppklares ved sentrifugering eller filtrering før testen.

Lagring av prøver

Prøver bør lagres ved 2-8°C og testes innen 7 dager (tilsetting av 0.1% natriumazid er høyt anbefalt). Dersom en lengre lagringsperiode er forventet, alikvot og lagre prøvene under -20°C. Unngå gjentatt tining og frysing.

Testprosedyre

A. Forberedelse av reagensmidler

1. Varm opp alle komponenter og kliniske prøver som skal testes til romtemperatur. Miks negativ kontroll, positiv kontroll og de kliniske prøvene godt før bruk.
2. Avgjør totalt antall prøver som skal testes. I tillegg til prøvene, må følgende være inkludert i hver test: to brønner med negativ kontroll og en brønn med positiv kontroll.
3. Fjern mikrotiterplaten fra aluminiumsposen ved å kutte en ende nær forseglingen. La nødvendig antall remser (i henhold til antall prøver som skal testes) sitte i 96 brønnsrammen.
4. Fortynn den konsentrerte vaskebufferen 1/20 med dobbelt avionisert eller destillert vann. For eksempel, for å forberede en liter vaskebuffer, tilsett 50ml konsentrert vaskebuffer til 950ml med dobbelt avionisert eller destillert vann.

B. Inkubering av serumsprøver og kontroller

5. Fortynn hvert pasientserum 1/105 med medfølgende serumfortynner som følger: Tilsett 10µl med pasientserum til 200µl av serumfortynner (1/21), og fortynn videre ved å tilsette 25µl av 1/21 fortynner til 100µl med serumfortynner.
6. Dispenser 50µl positiv kontroll, negativ kontroll og 1/105 fortynnet serum i adskilte brønner på testremsen. **Negativ kontroll bør pipetteres til to adskilte brønner.**
7. Dekk remsene med et platedeksel og inkuber i 1 time ved 37°C i et fuktighetskammer.
8. Kasser det flytende innholdet i brønnene.
9. **Vaskesteg:** Fyll hver brønn med vaskebuffer (300-350µl) opp til enden av brønnen og forkast væsken, gjenta dette steget to ganger, for totalt tre vaskesteg.
10. Tørk remsene og rammen ved å banke dem forsiktig over rent trekkpapir.

C. Inkubering med konjugat

11. Konsentrert HRP-konjugert anti-humant IgM bør fortynnes til arbeidsløsning kort tid før bruk. Fortynn den konsentrerte HRP-konjugerte anti-humane IgM 1/300 med konjugatfortynner. For eksempel, for to remser, forbered minimum 3ml med fortynnet HRP-konjugat (10µl med konsentrert HRP-konjugert anti-humant IgM blandes med 3ml konjugatfortynner).
12. Dispenser 50µl med fortynnet konjugat i hver kilde.
13. Dekk remsene med et platedeksel og inkuber i 1 time ved 37°C i et fuktighetskammer.
14. Forkast det flytende innholdet og vask som beskrevet i steg 9-10.

D. Inkubering med TMB - substrat

15. Dispenser 100µl TMB-substrat i hver brønn, dekk remsene med et platedeksel og inkuber ved romtemperatur i 15 minutter.

16. Stopp reaksjonen ved å tilsette 100µl med stoppløsning (1M H₂SO₄) til hver brønn.

E. Avlesning av resultater

17. Avles absorpsjonen ved 450nm og noter resultatene. Avlesningstiden bør ikke overskride 30 minutter etter stopping av kromogenisk reaksjon.

Merk: Alle luftbobler før fjernes før avlesing. Bunnen av ELISA-platen bør tørkes forsiktig av.

Testvalidering

Følgende kriterier må være møtt for at testen skal være gyldig. Dersom disse kriteriene ikke er møtt, bør testen vurderes som ugyldig og bør gjentas.

1. Positiv kontroll: Absorpsjonsverdien bør være: ≥ 0.8 ved 450nm.

2. Negativ kontroll: Gjennomsnittlig absorpsjonsverdi for negativ kontroll bør være: $0.1 < NC \leq 0.4$ ved 450nm.

Beregning av avbrytelseverdi (Cut-Off Value (COV)) og av avbrytelsesindeks (Cut-Off Index (COI))

Avbrytelseverdien beregnes etter følgende formel:

$$COV = NC \times 2$$

NC = Gjennomsnittlig absorpsjon ved 450nm av negativ kontroll kjørt i duplikat. For å normalisere resultatene innhentet i forskjellige tester, beregnes avbrytelsesindeks etter følgende formel:

$$COI = \frac{\text{Serumprøve-absorpsjon ved 450nm}}{COV}$$

Tolking av resultater

Tabell 1: Sammenheng mellom absorpsjonen ved 450nm og nærværet av *C. pneumoniae* IgM antistoffer

Absorpsjon (450nm)	COI	Resultat	Diagnostisk tolkning
O.D < 1.4xCOV	< 1.4	Negativ	ingen påviselige IgM-antistoffer Ingen indikasjon på eksisterende infeksjon av <i>C.pneumoniae</i>
1.4xCOV ≤ O.D ≤ 1.5xCOV	1.4-1.5	På grensen	lavt nivå av IgM-antistoffer Indikasjon på mulig utsettelse for <i>C.pneumoniae</i> . Andre prøvetest påkrevd etter 2-4 uker ¹
O.D > 1.5xCOV	> 1.5	Positiv	Indikasjon på eksisterende <i>C.pneumoniae</i> infeksjon

¹ Ved grenseresultater bør en andre serumprøve tas 2-4 uker senere og testes sammen med den første prøven.

Om grenseresultat gjentas må prøveeksemplaret betraktes som negativt.

For å oppnå en mer omfattende antistoff-profil, bør IgG og IgA også testes.

Tabell 2: Tolking av resultater basert på kombinasjonen av IgG-, IgA- og IgM-antistoffer.

Nivå av <i>C. pneumoniae</i> antistoffer			Tolking av resultater
IgM	IgG	IgA	
Negativ	Negativ	Negativ	Ingen indikasjon på <i>C. pneumoniae</i> infeksjon
Positiv	Negativ eller positiv	Negativ eller positiv	Indikasjon på eksisterende infeksjon
Negativ	Positiv	Negativ	Indikasjon på tidligere eller eksisterende infeksjon.
Negativ	Positiv eller Negativ	Positiv	Indikasjon på eksisterende eller kronisk infeksjon

Testbegrensinger

- Ingen enkelt serologisk test bør brukes som endelig diagnose. Alle kliniske data og laboratorie-data bør tas med i vurderingen.
- Prøver tatt for tidlig under primær infeksjon vil kanskje ikke inneholde påviselige antistoffer. Dersom klamydisk infeksjon er mistenkt, bør en ny prøve innhentes 2-4 uker senere og testes parallelt med den originale prøven.

Ytelseskaraktistikker

Tabell 3: Sammenligning av SeroCP™ IgM med intern *Chlamydia* IgM SeroFIA™

SeroCP™ IgM ble evaluert mot intern *Chlamydia* IgM SeroFIA™ (Savyon Diagnostics Ltd. Cat. No. 512-01). Studien ble utført ved to medisinske sentre ved bruk av 113 serumprøver fra symptomatiske (33) og friske barn (80).

SeroFIA™ SeroCP™	Positiv	Negativ	Total
Positiv	30	4	34
Negativ	3	76	79
Total	33	80	113

Sensitivitet: $30/33 \times 100 = 91\%$

Nøyaktighet: $76/80 \times 100 = 95\%$

Gjennomsnittlig overenstemmelse: $106/113 \times 100 = 94\%$

Presisjon

Intra-analyse (innen)

Prøve	Ant. kopier	Gjennomsnittsverdi	CV%
Positiv	10	1.469	2.3
Negativ	10	0.236	4.7

Intra-analyse (mellom)

Prøve	Ant. kopier	Gjennomsnittsverdi	CV%
Positiv	10	0.605	5.4
Negativ	10	0.163	6.0

Bibliografi

1. Myhra, W., Mordhors, C.H., Wang, S.P., Grayston, J.T., (1990). Clinical features of *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in Denmark 1975-1987. In: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, et al., eds. Chlamydial infections. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 422-425.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann. Intern. Med. 116: 273-278.
3. Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Hocberg, G., Potashnik, G., Sarov, B. and Insler, V. (1986). Specific IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in infertile women. In. J. Fertil. 31 (3): 193-197.
4. Campbell, L.A. (1993). PCR detection of *Chlamydia pneumoniae* In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
5. Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic evolution of serum *chlamydia* antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.
6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinon, M., Eckman, M.R., Makela, P.H. and Valtonen, V. (1988). Serological Evidence of an Association of a Novel *Chlamydia* TWAR with Chronic Coronary Heart Disease and Acute Myocardial Infarction. Lancet. 2: 983-986.
7. Grayston, J.T., Cambell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-625.
8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Mannin, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.



European Authorized Representative: Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels
Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net Mobile: +32.475.45.46.60