



SeroCP™ IgM

Enzym -Länkad Immunsorbent Assay (ELISA) för bestämning av specifika IgM antikroppar mot *Chlamydia pneumoniae* i humanserum

Bruksanvisning

Test kit för 96 bestämningar
(Artikel Nr A192-01M)

Test kit för 192 bestämningar
(Artikel Nr B192-01M)

För *In Vitro* Diagnostisk användning

Förvaras i 2-8°C. Frys ej

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Användningsområde

SeroCP™ IgM är en Enzym -Länkad Immunsorbent Assay (ELISA) för bestämning av artspecifika IgM antikroppar mot *Chlamydia pneumoniae* i humanserum.

Testet möjliggör tidig diagnos av pågående infektion genom bestämning av IgM antikroppar från ett enda serumprov.

För *In Vitro* Diagnostisk användning.

Introduktion

Chlamydia pneumoniae (TWAR) är ett oföroutsägbart infektiöst agens med ett antal kliniska manifestationer inkluderande övre och nedre luftvägarna (1). Majoriteten av *C. pneumoniae* infektionerna är milda och asymptomatiska men kan även orsaka allvarliga sjukdomar som svalginflammation, bihåleinflammation, akut bronkit och omgivningsförvärd pneumoni. Oupptäckt och obehandlad infektion kan leda till ihållande och kronisk sjukdom. Färsk data indikerar ett troligt samband mellan *C. pneumoniae* och kronisk sjukdom (2).

Seroprevalensen för *C. pneumoniae* bland barn är låg men ökar kraftigt fram till medelåldern och kvarstår hög i högre ålder (>50%).

Problem vid provtagning och infektionsområdets otillgänglighet påverkar användbarheten av direktpåvisande metoder. Serologiska test används därför i rutin och ger ett icke-invasivt verktyg vid identifikationen av både distal och kronisk chlamydia infektion (3) där direkta detektions metoder sällan är effektiva (4). Närvaron av en viss antikroppstyp kan även antyda sjukdomsstadie.

Primär chlamydia infektion karaktäriseras av ett dominant IgM svar inom 2-4 veckor och ett fördröjt IgG och IgA svar inom 6-8 veckor. Efter en akut *C. pneumoniae* infektion försvinner vanligtvis IgM antikropparna inom 2-6 månader (5), IgG antikroppstiter avtar vanligtvis sakta medan IgA antikropparna tenderar att försvinna snabbt (6).

När primär chlamydia infektion misstänks är bestämning av IgM av hög diagnostisk vikt (7).

Vid återkommande eller kronisk infektion är prevalensen av IgM låg och därför behöver inte frånvaro av IgM nödvändigtvis exkludera en pågående infektion.

Vid reinfektion stiger IgG och IgA nivåerna snabbt oftast inom 1-2 veckor (8).

IgA antikroppar har visat sig vara en tillförlitlig immunologisk markör för primär, kronisk och ofta återkommande infektion. Dessa antikroppar avtar vanligtvis snabbt till basnivå efter behandling och eliminering av chlamydia infektion (3). Kvarstående förhöjd IgA antikroppstiter anses generellt som ett tecken på kronisk infektion (6).

IgG antikroppar kvarstår under långa perioder och avtar mycket sakta. Därför är påvisandet av IgG antikroppar i huvudsak indikativt på chlamydia infektion under en obestämmd tid. En fyrfaldig ökning i IgG eller höga nivåer av IgG antikroppar kan vara indikativt för en pågående kronisk infektion.

SeroCP™ är ett ELISA test där renade "elementary bodies" från *C. pneumoniae* (TWAR-183) används som antigen för att bestämma antikroppssvar hos människa. För en fullständig diagnos av en pågående, kronisk eller tidigare infektion rekommenderas en bestämning av IgG, IgM och IgA antikroppar mot *C. pneumoniae*.

Testprincip

- SeroCP™ mikrotiterplattor belagda med renade "elementary bodies" från *C. pneumoniae* (TWAR - 183) antigen
- Det serum som skall testas späds och inkuberas på SeroCP™ plattan i 1 timme vid 37°C. Vid detta steg binds *C.pneumoniae* antikroppar till det immobiliserade antigenet.
- Icke-specifika antikroppar tas bort genom tvätt.
- Anti-human IgM konjugerat till horseradish peroxidase (HRP) tillsätts och inkuberas 1 timme vid 37°C. Vid detta steg binds HRP-konjugatet till de tidigare bundna antigen-antikroppskomplexet.
- Obundet konjugat tas bort genom tvätt.
- Vid tillsättning av TMB-substrat, hydrolyseras substrat av peroxid och en blå lösning bildas av det reducerade substratet.
- Vid tillsättning stopplösning övergår den blå färgen till gul och avläses med ELISA läsare vid en våglängd på 450nm.
- Absorbansen står i proportion till nivån av specifika antikroppar som bundits till de på plattan belagda antigenen.

Testprocedur

Tillsätt 2x50µL Negativ kontroll, 1x50µL Positiv kontroll och spädda patientprov till mikrotiterplattans brunnar belagda med *C. pneumoniae* antigen

↓
Täck plattan och inkubera 1 timme vid 37°C och 100 % fuktighet

↓
Tvätta 3 gånger med tvättbuffert

↓
Tillsätt 50µL 1/300 utspädd HRP konjugat
↓
Täck plattan och 1 timme vid 37°C och 100 % fuktighet
↓
Tvätta 3 gånger med tvättbuffert
↓
Tillsätt 100µL TMB-Substrat
↓
Täck plattan och inkubera 15 minuter i rumstemperatur
↓
Tillsätt 100µL Stopplösning
↓
Mät absorbansen vid 450nm
↓
Beräkna och tolka resultaten

Kit innehåll

Test kit för 96 bestämningar

Art nr A192-01M

1. ***C.pneumoniae* antigen belagd mikrotiterplatta:** 96 itubrytbara brunnar (8x12) belagda med *C.pneumoniae* antigen, i en aluminiumförpackning innehållande torkmedel.

1 Platta

2. **Koncentrerad tvättbuffert (*Wash Buffer*) (20X):** PBS - Tween buffert

1 Flaska, 100 mL

3. **IgM- Serumspädningsbuffert (*IgM- Serum Diluent*) (röd):** Anti-human IgG buffertlösning färdig för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin som konserveringsmedel.

1 Flaska, 60 mL

4. **Konjugatspädningsbuffert (*Conjugate Diluent*) (grön):** Buffertlösning färdig för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin som konserveringsmedel.

1 Flaska, 40 mL

5. **Negativ Kontroll:** *C.pneumoniae* IgM negativt humanserum, färdigt för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin och mindre än 0.1% natriumazid som konserveringsmedel.

1 Flaska, 2.5 mL

6. **Positiv Kontroll:** *C.pneumoniae* IgM positivt humanserum, färdigt för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin och mindre än 0.1% natriumazid som konserveringsmedel.

1 Flaska, 2mL

7. **Koncentrerat HRP-konjugat (300X):** Horseradish Peroxidase (HRP) konjugerat anti-human IgM (miu kedje specifikt). Innehåller mindre än 0.05% proclin som konserveringsmedel.

1 Flaska, 0.2 mL

8. **TMB-Substrat:** Lösning färdig för användning. Innehåller 3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine som kromogen och peroxid som substrat

1 Flaska, 14mL

9. **Stopplösning:** Färdig för användning. Innehåller 1M H₂SO₄.

1 Flaska, 15 mL

10. **Lock till platta:** 1 st

11. **Instruktions Manual:** 1 st

Test kit för 192 bestämningar

Art nr B192-01M

1. ***C.pneumoniae* antigen belagd mikrotiterplatta:** 96 itubrytbara brunnar (8x12) belagda med *C.pneumoniae* antigen, i en aluminiumförpackning innehållande torkmedel.

2 Plattor

2. **Koncentrerad tvättbuffert (*Wash Buffer*) (20X):** PBS - Tween buffert

2 Flaskor, 100 mL i vardera

3. **IgM- Serumspädningsbuffert (*IgM- Serum Diluent*) (röd):** Anti-human IgG buffertlösning färdig för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin som

2 Flaskor, 60 mL vardera

4. **Konjugatspädningsbuffert (*Conjugate Diluent*) (grön):** Buffertlösning färdig för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin som konserveringsmedel.

1 Flaska, 80 mL

5. **Negativ Kontroll:** *C.pneumoniae* IgM negativt humanserum, färdigt för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin och mindre än 0.1% natriumazid som konserveringsmedel.

1 Flaska, 2.4 mL

6. **Positiv Kontroll:** *C.pneumoniae* IgM positivt humanserum, färdigt för användning. Innehåller mindre än 0.05% Proclin och mindre än 0.1% natriumazid som konserveringsmedel.

1 Flaska, 1.25 mL

7. **Koncentrerat HRP-konjugat (300X):** Horseradish Peroxidase (HRP) konjugerat anti-human IgM (miu kedje specifikt). Innehåller mindre än 0.05% proclin som konserveringsmedel

1 Flaska, 0.2 mL

8. **TMB-Substrat:** Lösning färdig för användning. Innehåller 3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine som kromogen och peroxid som substrat

1 Flaska, 24mL

9. **Stopplösning:** Färdig för användning. Innehåller 1M H₂SO₄.

1 Flaska, 30 mL

10. **Lock till platta:** 2 st

11. **Instruktions Manual:** 1 st

Material som krävs men inte medföljer

1. Rena provrör för spädning av patientserum.
2. Engångsflaska av plast för spädning av koncentrerat HRP- konjugat.
3. Inställbara mikropipetter och flerkana pipetter (5-50, 50-200 and 200-1000µL) och engångspetsar.
4. Mätglas, 1 L
5. Mätglas, 50mL
6. Tvättflaska
7. Absorberande papper
8. Vortex mixer
9. Vattenbad för 37°C, med lock alternativt fuktkammare placerad i 37°C inkubator
10. ELISA-läsare med 450nm filter
11. Destillerat eller dubbelt avjoniserat vatten

Varning och försiktighet

För In Vitro Diagnostiskt bruk

1. Detta kit innehåller humant sera som testats med tekniker godkända av FDA och har befunnits negativa för HBsAg och för antikroppar mot HCV samt HIV1 och 2. Eftersom ingen nu känd metod kan erbjuda fullständig garanti att produkter som härrör från humant blod inte överför smitta, måste alla humana blodprodukter i detta kit hanteras som potentiellt infektiöst serum eller blod i enlighet med de rekommendationer som publicerats i CDC/NH-manualen "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1988".
2. TMB-substrat är en lösning som irriterar hud och slemhinnor. Undvik direktkontakt.
3. Alla komponenter i detta kit kalibreras och testas för varje enskilt lot. Det är inte tillrådligt att blanda komponenter från olika lot nummer då det kan påverka resultatet.
4. Utspädd svavelsyra (1M H₂SO₄) är irriterande för hud och ögon. Om syran kommer i kontakt med ögonen skölj genast med vatten och kontakta läkare.

Förvaring och hållbarhet

1. Alla reagenser ska förvaras i 2-8°C. Öppnade reagensflaskor är hållbara fram till det datumet som står på förpackningen. Om de öppnade produkterna skulle utsättas för rumstemperatur under några timmar kommer reagenserna ej till skada. **FRYS EJ!**
2. När kitet har öppnats är det hållbart i 90 dagar
3. Oanvända strips måste återförslutas i aluminiumförpackningen med torkmedel genom att rulla den öppna änden och försegla tätt med tejp över hela öppningen.
4. Kristaller kanske bildas i den 20x koncentrerade Tvättbufferten om den förvaras kallt. Detta är alldeles normalt. Lös upp kristallerna genom att värma upp bufferten till 37°C innan spädning. Utspädd lösning förvaras i 2-8°C i upp till 21 dagar.

Serum Provtagning

Serumprov tas aseptiskt genom användning av standardtekniker. Värmeinaktiverat serum skall inte användas. Lipemiskt, grumlig eller kontaminerat serum är inte att rekommendera. Partiklar och utfällningar i serum kan ge felaktiga resultat. Sådana prov ska klargöras med centrifugering eller filtrering innan testet påbörjas.

Förvaring av prover

Prov skall förvaras i 2-8°C och testas inom 7 dagar (tillsats av 0.1% natriumazid rekommenderas). Om man kan förvänta sig längre förvaringsperiod, håll av serum och förvara detta i -20°C. Undvik upprepade upptining och frysning.

Test Procedur

A. Förberedelse av reagens

1. Alla komponenter och de kliniska proven som ska testas skall uppnå rumstemperatur. Blanda negativ kontroll,

positiv kontroll och de kliniska proven väl innan användning.

2. Fastställ det totala antalet prov som ska testas. Förutom proven måste följande ingå vid varje körning: Två brunnar för negativ kontroll och en brunn för positiv kontroll.
3. Tag ut mikrotiterplattan ur aluminiumförpackningen genom att klippa upp nära förseglingen. Placera det antal strips i ramen som behövs (beroende på antal prover som skall testas).
4. Späd ut den koncentrerade tvättbufferten 1/20 med dubbelt avjoniserat eller destillerat vatten. Exempel: För att erhålla 1 L tvättlösning tillsätt 50mL koncentrerad tvättbuffert till 950mL dubbelt avjoniserat eller destillerat vatten

B. Inkubation av serumprover och kontroller

5. **Enstegsspädning:** Späd varje patientserum 1/105 med bifogad serumspädningsbuffert enligt följande: Tillsätt 5 µL patientserum till 520µL serumspädningsbuffert.
Tvåstegsspädning: Späd varje patientserum 1/105 med bifogad serumspädningsbuffert enligt följande: Tillsätt 10 µL patientserum till 200µL serumspädningsbuffert (1/21), och späd sedan vidare genom att tillsätta 25µL 1/21 spädning till 100µL serumspädningsbuffert.
Observera: Serumspädningsbufferten innehåller antihumant IgG för att ta bort IgG-antikroppar från humanserum.
6. Dispensera 50µL Positiv kontroll, Negativ Kontroll samt de 1/105 utspädda serumproverna i separata brunnar. **Den Negativa kontrollen skall dispenserar i två separata brunnar.**
7. Täck stripsen med locket och inkubera i fukt-kammare 1 timme i 37°C.
8. Häll av vätskan i brunnarna.
9. **Tvätt steg:** Fyll varje brunn upp till kanten med tvättbuffert (300-350µL) och håll sedan av vätskan. Upprepa detta steg tre ggr.
10. Torka stripsen och ramen genom att försiktigt knacka dem mot rent absorberande papper.

C. Inkubation med konjugat

11. Koncentrerat HRP-konjugerat anti-human IgM skall spädas till färdig brukslösningen kort tid innan den ska användas. Späd det koncentrerade HRP-konjugerade antihuman IgM 1/300 med konjugatspädningsbuffert. Exempel: till två strips förbereds ett minimum av 3ml konjugat enligt följande: 10µL koncentrerat HRP-konjugerat antihumant IgM blandas med 3mL konjugatspädningsbuffert.
12. Dispensera 50µL utspädd konjugat i varje brunn.
13. Täck stripsen med lock och inkubera i fukt-kammare 1 timme i 37°C.
14. Häll av vätskan och tvätta enligt steg 9-10.

D. Inkubation med TMB - Substrat

15. Tillsätt 100µL TMB-Substrat i varje brunn, täck stripsen med lock och inkubera i rumstemperatur **15 minuter**.
16. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 100 µL stopplösning (1M H₂SO₄) i varje brunn.

E. Fastställande av resultat

17. Avläs absorbansen vid 450nm och notera resultaten. Avläsning bör ske inom 30 minuter efter att den kromogena reaktionen stoppats.

Observera: Alla luftbubblor skall avlägsnas innan avläsning. Botten på ELISA-plattan skall försiktigt torkas av.

Testvalidering

Följande kriterier måste vara uppfyllda för att testet skall vara giltigt. Om de inte uppfylls anses testet ogiltigt och skall upprepas.

1. **Positiv kontroll:** Absorbansvärdet skall vara: ≥ 0.8 vid 450nm.
2. **Negativ kontroll:** Den genomsnittliga absorbansvärdet för den negativa kontrollen skall vara:
 $0.1 < NC \leq 0.4$ vid 450nm

Beräkning av Cut Off Värde (COV) och Cut Off Index (COI)

Cut-off värdet beräknas enligt nedanstående formel:

$$COV = NC \times 2$$

NC = Den genomsnittliga absorbansen vid 450nm för den negativa kontrollen körd i duplikat.

För att normalisera resultat som erhålls i olika test beräknas cut-off index enligt nedanstående formel:

$$COI = \frac{\text{Serumprovets absorbans vid 450nm}}{COV}$$

Tolkning av resultat

Absorbans (450nm)	COI	Resultat	Diagnostisk tolkning
$O.D < 1.4 \times COV$	< 1.4	Negativ inga påvisbara IgM antikroppar	Ingen indikation på pågående infektion med <i>C.pneumoniae</i>
$1.4 \times COV \leq O.D \leq 1.5 \times COV$	1.4-1.5	Gränsvärde låga nivåer av IgM antikroppar	Indikation på möjlig exponering av <i>C.pneumoniae</i> Ett andra prov för testning krävs efter 2-4 veckor ¹
$O.D > 1.5 \times COV$	> 1.5	Positiv relevant nivå av IgM antikroppar	Indikation på pågående infektion av <i>C.pneumoniae</i>

1. Vid gränsvärdes resultat bör ett andra serumprov tas 2-4 veckor senare och testas tillsammans med det första provet.
Om fortsatt gränsvärdes resultat skall provet anses negativt.

För en mer omfattande antikroppsprofil bör även IgG och IgA testas

Tolkning av resultat baserat på kombinationen av IgM, IgG och IgA antikroppar.

Nivå av <i>C. pneumoniae</i> antikroppar			Tolkning av resultat
IgM	IgG	IgA	
Negativ	Negativ	Negativ	Ingen indikation på <i>C.pneumoniae</i> infektion
Positiv	Negativ eller Positiv	Negativ eller Positiv	Indikation på pågående infektion
Negativ	Positiv	Negativ	Indikation på tidigare eller pågående infektion
Negativ	Positiv eller Negativ	Positiv	Indikation på pågående eller kronisk infektion

Testets begränsningar

1. Man bör inte basera en slutlig diagnos på ett enda serologiskt test. Alla kliniska och laboratoriedata bör tas i beaktande.
2. Prov som tagits för tidigt under en primärinfektion kanske inte innehåller påvisbara antikroppar. Vid misstanke om chlamydia infektion bör ett andra prov tas 2-4 veckor senare och testas parallellt med det ursprungliga provet.

Funktionsprestanda

Jämförelse av SeroCP™ IgM med Chlamydia IgM SeroFIA™

SeroCP™ IgM utvärderades mot Chlamydia IgM SeroFIA™ (Savyon Diagnostics Ltd. Art nr 512-01).

Studien genomfördes vid två medicinska center som använde 113 serumprover från symptomatiska (33) och friska barn (80).

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

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

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

Överensstämmelse: $106/113 \times 100 = 94\%$

Precision

Intra-assay (inom-körning)

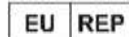
Prov	Antal replikat	Medelvärde	CV%
Positiv	10	1.469	2.3
Negativ	10	0.236	4.7

Inter-assay (mellan-körning)

Prov	Antal replikat	Medelvärde	CV%
Positiv	10	0.605	5.4
Negativ	10	0.163	6.0

Bibliografi

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
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. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984). *Chlamydia pneumoniae* and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
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:

MedNet EC-REP GmbH

Borkstrasse 10,

48163 Muenster, Germany



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003

ISRAEL

Tel.: +(972).8.8562920

Fax: +(972).8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Symbols for IVD components and Reagents

	Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Manufacturer
	Store at 2°C – 8°C
	Expiry Date
	Warning
	Danger
	Contains Sufficient for 96 tests
	Consult Instructions for Use
	CE mark
	EU Authorized representative
	Batch Number