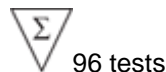


Chlamydia pneumoniae

IgA Micro-IF Test kit



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



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

11.09.2015

Gebrauchsanleitung

Nur zum *in vitro* Diagnostik Gebrauch

Chlamydia pneumoniae IgA Micro-IF Test kit

Indirekter Mikroimmunfluoreszenztest zur Bestimmung von Antikörpern gegen Chlamydia pneumoniae im Humanserum oder **Plasma**

Produkt Nr. 61 08 390 (20x21well slides)
Produkt Nr. 61 08 392 (20x12well slides)

Inhaltsverzeichnis	Seite
Anwendungsbereich	19
Einführung	19
Testprinzip	19
Kit - Inhalt	20
Reagenzienvorbereitung	20
Zusätzlich benötigtes Material	21
Vorsichtsmaßnahmen	21
Probenentnahme und Behandlung	21
Testdurchführung	22
Ergebnisse	24
Interpretation der Ergebnisse	24
Interpretationsanleitung	25
Testcharakteristika	25
Begrenzung des Testsystems	26
Fehlersuche	26
Literatur	27

ANWENDUNGSBEREICH

Der Labsystems Diagnostics Chlamydia pneumoniae IgA Mikro-IF wurde entwickelt zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *Chlamydia pneumoniae* im menschlichen Serum oder **Plasma**.

EINFÜHRUNG

Seit der Beschreibung von *Chlamydia pneumoniae* als Pathogen (1) 1986, hat diese Spezies weltweite Bedeutung als Infektionsauslöser erlangt. *C. pneumoniae* ist in erster Linie ein Erreger des Respirationstraktes, der ungefähr 10-20% der erworbenen Pneumonien bei Erwachsenen und Kinder, sowie 10-20% der akuten Bronchitiden bei Erwachsenen verursacht (2, 3, 4). Zusätzlich verursacht er Sinusitis, akute Pharyngitis und kann Asthma auslösen (5). Die meisten Infektionen mit diesem Mikroorganismus verlaufen subklinisch und asymptomatisch, klinische Verlaufsformen sind selten (3). Chronische *C. pneumoniae* Infektionen werden als zusätzlicher Faktor bei der Entwicklung von Artherosklerose diskutiert (6, 7).

Seroepidemiologische Studien (8, 9, 10, 11) in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen ergaben, dass die Seroprävalenz bei jungen Kindern und Jugendlichen stark zunimmt. Nach dem jugendlichen Alter steigt die Prävalenz weiterhin an, und kann fast eine komplette Sättigung der IgG und IgA - Antikörper im Alter aufweisen (11). Epidemische Zyklen von Infektionen mit *C. pneumoniae* wurden in Intervallen von 4 - 7 Jahren beschrieben und sind von der Bevölkerungsdichte abhängig (8).

Bis heute basieren die meisten Untersuchungen auf serologischer Diagnostik, die Modifikationen des Mikro-Immunfluoreszenz (MIF) Tests verwendet (8). Frühe Studien wurden mit der Komplementfixation (CF) durchgeführt, welche über viele Jahre zur Erkennung der Psittacose verwendet wurden. Dieser Test ist Genus - spezifisch und zeigt eher positive Ergebnisse bei frühen Infektionen, als bei Reinfektionen (8).

Alle Chlamydien Spezies, *C. trachomatis*, *C. psittaci* und *C. pneumoniae* haben Spezies- und Subspezies- spezifische Antigene als Oberflächenbestandteile. Zusätzlich zu diesen Antigenen haben sie alle ein genusspezifisches Lipopolysaccharid (LPS-) Antigen.




Der Labsystems Diagnostics Chlamydia pneumoniae Mikro-IFT benutzt als Antigen *C. pneumoniae* Elementarkörperchen (EK), die infektiösen Zellformen. *C. psittaci* und *C. trachomatis* Antigen (EK) sind in dem Test als Kontrollen enthalten. Um Kreuzreaktionen zwischen den Chlamydien Spezies zu reduzieren, wurde die immunologische Aktivität des Chlamydien LPS - Antigen bei *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* auf spezielle Art reduziert. Da das LPS - Antigen nicht von den *C. psittaci* Elementarkörperchen entfernt wurde, dient dieses Antigen als Kontrolle für beide: LPS - und *C. psittaci* positive Seren.

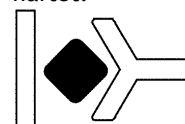
Für die zuverlässige Diagnose einer *C. pneumoniae* Infektion wird empfohlen die drei Haupt-immunglobulinklassen (IgG, IgM und IgA) in gepaarten Serumproben zu untersuchen. In einer Studie mit erwachsenen Pneumoniae Patienten hat man festgestellt, dass ein Fünftel der *C. pneumoniae* Infektionen ohne die Untersuchung des IgA nicht erkannt worden wären (12). In der Fachliteratur wird IgA als ein Marker von chronischen Chlamydien Infektionen diskutiert (13,14,15).

Die Firma Labsystems Diagnostics produziert *C. pneumoniae* IgG/IgM Mikro-IFT und *C. pneumoniae* IgA Mikro -IFT.

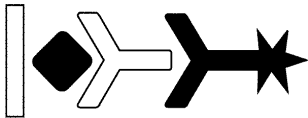
TESTPRINZIP

Dieser Test basiert auf dem indirekten Nachweis von IgA Antikörpern gegen *C. pneumoniae* unter Einsatz von Fluorescein Isothiocyanat (FITC) zur Markierung.

* Wenn im Patientenserum *C. pneumoniae* Antikörper () vorhanden sind, binden sich diese an das *C. pneumoniae* Antigen (), das auf der Oberfläche () des Objektträgers haftet.



* Überschüssige Patientenprobe wird durch Waschen entfernt und mit Fluorescein konjugierte Antihuman Antikörper werden zugegeben.

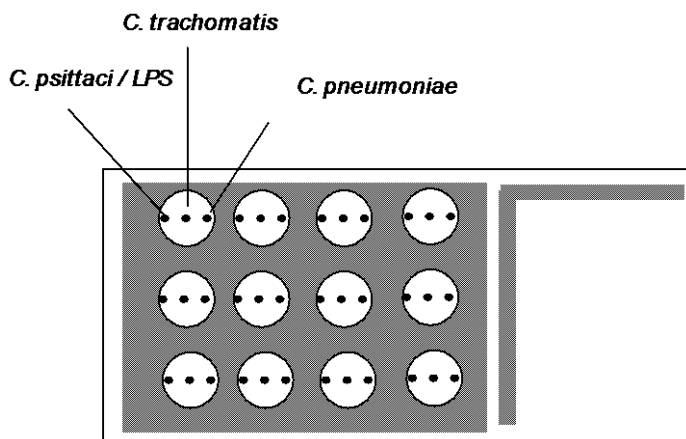


* Der Objektträger wird gewaschen und eine grüne Fluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen.

KIT INHALT

- Nur zum *in vitro* Diagnostik Gebrauch.
- Tragen Sie Einmalhandschuhe während des Testansatzes und waschen Sie sich anschließend sorgfältig die Hände.
- Jeder Kit enthält 20 Objektträger mit 21 Feldern (Artikel Nr. 61 08 390), oder 12 Feldern (Artikel Nr. 61 08 392) markiert mit 3 Chlamydien Antigenen (*C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*).
- Die Reagenzien sind ausreichend um 136 Seren (20x21 Felder) oder 73 Seren (20x12 Felder) auf IgA (3 Verdünnungen/Serum) zu testen.
- Lagerung der Reagenzien und der Objektträger bei +2°C - +8°C. Vermeiden Sie unnötigen Lichteinfluß. Die lichtempfindlichen Reagenzien sind die Konjugate.
- Benutzen Sie keine Reagenzien über das Verfalldatum hinaus.
- **Es ist unbedingt zu achten, die Objektträgerfolie nach Entnahme der benötigten Anzahl von Objektträgern mit Trockenbeutel wieder fest zu verschließen.**

1. Objektträger, 20x21 Felder, (20x12 Felder)
Objektträger, markiert mit inaktivierten *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* Elementarkörperchen.



Hinweis: Bei der mikroskopischen Betrachtung werden die Antigene gewöhnlich **seitenverkehrt dargestellt**, da das Mikroskop das Abbild in der Regel umkehrt (siehe Sie Seite 6).

2. Probenverdünnungslösung, 50 ml
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4 ± 0,2, mit speziellen Zusätzen und 15mM Na-Azid als Konservierungsmittel

3. *C. pneumoniae* IgA positives Kontrollserum, 0,3 ml
Schraubverschluß: **grün**
Verdünntes Humanserum mit speziellen Zusätzen und 15mM Na-Azid als Konservierungsmittel

4. *C. pneumoniae* negatives Kontrollserum, 0,3 ml
Schraubverschluß: **weiß**
Verdünntes Humanserum mit speziellen Zusätzen und 15mM Na-Azid als Konservierungsmittel

5. Anti-Human IgA-FITC Konjugat (Kaninchen), 2x3 ml (1x3 ml)
Schraubverschluß: **grün**
Anti-human IgA konjugiert mit FITC, 0,001% Evans Blue zur Gegenfärbung, speziellen Zusätzen und 15mM Na-Azid als Konservierungsmittel

6. Eindeckmedium, 7 ml
Glycerol mit speziellen Zusätzen und 15mM Na-Azid als Konservierungsmittel.

Extra Tropfflaschen (Für Eindeckmedium, 3 ml), 1 Set
Tropfflaschen extra
Stecker
Deckel

Deckgläser, 30 Stck.

REAGENZIENVORBEREITUNG

Reagenz	Vorbereitung	Stabilität von geöffneten oder verdünnten Reagenzien (+2°C bis +8°C)
1. Antigen markierte Objektträger	Gebrauchsfertig	3 Monate
2. Probenverdünnungslösung	Gebrauchsfertig	8 Monate
3. <i>C. pneumoniae</i> IgA Positive Kontrolle	Gebrauchsfertig	8 Monate
4. <i>C. pneumoniae</i> Negative Kontrolle	Gebrauchsfertig	8 Monate
5. Anti-human-IgA FITC -Konjugat	Gebrauchsfertig	8 Monate
6. Eindeck-medium	Gebrauchsfertig	8 Monate

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 0,01 M Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4
- Präzisionspipetten:
(Ein- Kanalpipette Bereich z.B. 5-50 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl und Multi-channel 50-300 µl)
- Mikrotitrationsplatte mit 96 Vertiefungen
- Feuchte Kammer (ein Stapel feuchter Papiertücher oder saugfähiges Papier in einer Plastikbox)
- Papiertücher oder saugfähiges Papier
- Zeitschaltuhr (30 Min.)
- Inkubator 37° C
- Küvetten (Plastik oder Glas)
- Behälter oder Halterung für Objektträger
- Absorptionsreagenz (Reagenz zur Inaktivierung von IgG Antikörpern im menschlichen Serum, z.B. Labsystems Diagnostics' IgG blocking reagent, Produkt Nr.. 61 06 020). IgG Antikörper können den Nachweis von IgA Antikörpern stören. Die Benutzung eines IgG Absorbens macht die IgA Reaktionen stärker.
- Fluoreszenzmikroskop mit einem Filtersystem für Fluorescein Isothiocyanat (FITC), d.h. maximale Exzitationswellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 520-530 nm
- Immersionsöl für Mikroskopie mit nd. 1.516 (nicht-fluoreszierend), z.B.Olympus

VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für *in vitro* Diagnostik Gebrauch.

Warnung - potentiell infektiöses material:

Die Objektträger sind mit inaktivierten *C.pneumoniae*, *C.trachomatis* und *C.pittaci* Elementarkörperchen markiert. Trotz Inaktivierung gibt es keine komplette Sicherheit dafür, dass infektiöse Bestandteile nicht vorhanden sind. Daher müssen die Objektträger als potentiell infektiöses Material behandelt werden.

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" 1999.

Das Konjugat enthält den Farbstoff Evans Blue, der karzinogen sein könnte. Vermeiden Sie Hautkontakt, auch wenn die Konzentration des Farbstoffes sehr gering ist.

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

Vorsicht bei der Vernichtung von Reagenzien, die Na-Azid enthalten. Azide sind dafür bekannt, dass sie in Abflußrohren mit Blei und Kupfer reagieren, was bei Erschütterungen zur Detonation führen kann. Spülen Sie deshalb immer mit reichlich Wasser nach. Bitte beachten Sie die Vorsichtsmaßnahmen und Dekontaminationsvorschriften des National Institution for Occupational Safety and Health (16).

Vernichten Sie alle Materialien und Proben wie infektiöses Material (17, 18, 19, 20). 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.

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

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. Wieder verwendbare Glasgefäße müssen desinfiziert und frei von Überresten des Reinigungsmittels sein.

Lagerung der Reagenzien bei +2°C - +8°C. Bewahren Sie Reagenzien und Proben nicht in Kühlschränken mit Abtauautomatik auf. Vermeiden Sie unnötigen Lichteinfluss. Die einzigen lichtempfindlichen Reagenzien sind die Konjugate.

Benutzen Sie keine Reagenzien über das Verfalldatum hinaus.

Verwenden Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen - Nummern in einem Testansatz, da dadurch eventuell fehlerhafte Resultate auftreten können. Pipettieren Sie möglichst steril zur Vermeidung von Kontaminationen und falschen Ergebnissen. Die Verschlüsse der Fläschchen dürfen nicht vertauscht werden. Benutzen Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze.

Sie erreichen optimale Resultate, wenn Sie die Anweisungen genauestens befolgen. Präzises Pipettieren und striktes Einhalten der Inkubationszeiten und -temperaturen sind für ein gültiges Testergebnis absolut erforderlich!

Nach Beginn des Tests sollten alle Schritte nacheinander ohne Unterbrechung ausgeführt werden.

PROBENENTNAHME UND -VERARBEITUNG

Nach der Gewinnung sollten Serum- und **Plasma**proben gekühlt bei +4°C aufbewahrt werden. Wenn die Analyse nicht innerhalb **von einer Woche** durchgeführt werden kann, sollten die Proben bei -20°C oder besser bei -70°C eingefroren werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben sollte vermieden werden.

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

Mikrobielle Kontamination, starke Hämolyse oder Hyperlipämie der Serum- und **Plasma**proben können die Ergebnisse verfälschen.

Bei zu langer Lagerung von Serum- oder **Plasma**proben (länger als ein Jahr tiefgefroren) bilden sich möglicherweise Lipidaggregate, die unspezifische Ergebnisse verursachen können.

Die Chlamydia pneumoniae IgG, IgA und IgM EIAs können aus Serum und **Plasma** (EDTA, Heparin) durchgeführt werden. Gepaarte Proben sollten jedoch auf die gleiche Weise gewonnen werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

ÜBERSICHT

1. SCHRITT

Zugabe von 10 µl Serumverdünnung und 1 Tropfen der entsprechenden Kontrolle auf die Auftragsfelder des Objektträgers.

Inkubation der IgA OT's 30 Min. bei 37°C in einer feuchten Kammer.

OT waschen und gut trocknen.

2. SCHRITT

Zugabe von 1 Tropfen des entsprechenden Konjugates.

30 Min. Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer.

OT waschen und gut trocknen.

3. SCHRITT

Zugabe von Eindeckmedium auf den Objektträger und abdecken mit einem Deckgläschen.

Mikroskopieren der Objektträger

VORBEREITUNG

- Erwärmen Sie die Reagenzien und Patientenserum auf Raumtemperatur

- Nehmen Sie die in Folie verpackte Objektträgerbox aus dem Testkit und erwärmen Sie diese ca. 30 Minuten auf Raumtemperatur **bevor Sie die Folie öffnen**, um die Bildung von Kondenswasser zu vermeiden.

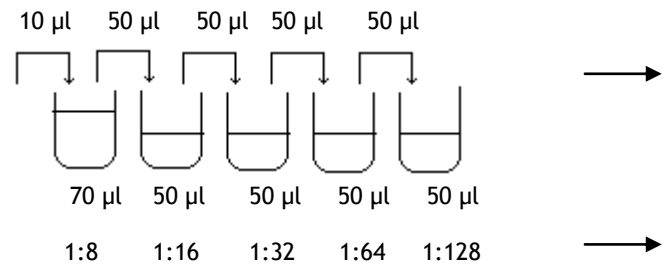
-Entnehmen Sie die Anzahl benötigter Objektträger aus der Objektträgerbox. Nicht benötigte OTs bitte sofort wieder in die Objektträgerbox und in die Folie mit Trockenbeutel verpacken und **die Folie wieder fest verschliessen**.

- Bereiten Sie eine feuchte Kammer vor

-Behandeln Sie die Objektträger vorsichtig, vermeiden Sie es die Antigenauftragstellen zu berühren

-Vor Gebrauch die Reagenzien gut mischen durch Schwenken des Behälters.

PROBENVORBEREITUNG



- Benutzen Sie eine Mikrotitrationsplatte mit 96 Vertiefungen für die Verdünnung der Serumproben. Für die 1:8 Verdünnung pipettieren Sie 70 µl Probenverdünnungslösung in die ersten Vertiefungen der horizontalen Reihen (für jedes Serum brauchen Sie eine Reihe) und geben 10 µl Patientenserum dazu. Gründlich mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Hinweis:

Die Kontrollen nicht verdünnen

Hinweis:

Bevor Sie IgA Antikörper testen, ist es möglich vorher die IgG Antikörper zu absorbieren (siehe Sie Seite 9). Die Verdünnung sollte folgendermaßen vorgenommen werden: Verdünnen Sie die IgA Proben 1:8 mit dem IgG Absorptions-Reagenz (z.B. Labsystems Diagnostics' IgG blocking reagent, cat. no 610 6020), inkubieren Sie 15 Minuten bei Raumtemperatur und verdünnen Sie dann noch weiter mit der Probenverdünnungslösung (1:16, 1:32, 1:64)

- Für jede Verdopplung der Verdünnung pipettieren Sie 50µl Probenverdünnungslösung in die nächsten Vertiefungen. Bereiten Sie die gewünschten Verdünnungen vor (50µl verdünntes Serum + 50 µl Probenverdünnungslösung) ausgehend von der 1:8 Verdünnung.

Wenn Sie den Test nach der Herstellung der Serumverdünnungen nicht weiterführen können, decken Sie die Mikrotitrationsplatte sorgfältig mit einer Plastikfolie ab und halten bei + 4°C. Die Serumverdünnungen sollten innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet werden.

PIPETTIEREN DER SERUMVERDÜNNUNGEN UND DER KONTROLLEN

- Jeder Objektträger hat 12 oder 21 Felder mit den 3 Chlamydien Antigenen in jedem Feld. Bevor Sie die Serumverdünnungen pipettieren, markieren Sie die Objektträger mit einem Bleistift.

Für jede Kontrolle benötigen Sie ein Feld.

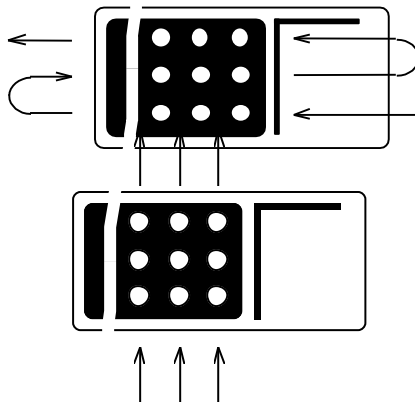
- Die folgenden Verdünnungen werden für die Bestimmungen empfohlen:

IgA 1:8, 1:32, 1:64

Es wird empfohlen, IgG, IgM und IgA Bestimmungen auf getrennten Objektträgern durchzuführen.

Pipettieren Sie vorsichtig 10 µl der Serumverdünnungen und einen Tropfen der Positiv- und Negativkontrolle auf die entsprechenden Felder.

Das Mikroskopieren der Objektträger ist einfacher, wenn Sie die Serumproben in folgender Reihenfolge pipettieren.



Um Fehler zu vermeiden beginnen Sie mit dem Pipettieren der letzten Auftragsstelle des Objektträgers. Sie müssen die Pipettenspitze innerhalb der Verdünnungen eines Serums nicht wechseln, wenn Sie mit der höchsten Verdünnung beginnen (z.B. 1:64).

INKUBATION

Legen Sie die Objektträger in eine feuchte Kammer und inkubieren die IgA Objektträger 30 Min. bei 37°C.

WASCHEN DER OBJEKTTRÄGER

Füllen Sie 4 Küvetten mit 0,01 M PBS, pH 7,4 und 2 Küvetten mit destilliertem Wasser. Das Volumen sollte ausreichen, um die Objektträger vollständig zu bedecken.

Schritt I

Spülen Sie alle Objektträger einzeln in der ersten PBS Küvette durch mehrmaliges Bewegen. Lassen Sie die überschüssige Flüssigkeit auf Papiertüchern ablaufen und geben Sie die Objektträger in eine entsprechende Halterung.

Schritt II

Schritt 2 kann nach zwei unterschiedlichen Methoden abgearbeitet werden.

Methode A

Geben Sie die Halterung mit den Objektträgern unverzüglich in die zweite PBS Küvette und bewegen sie ca. 20 mal auf und ab. Nehmen Sie die Halterung aus der Küvette, geben Sie nun die Halterung in die nächste Küvette und wiederholen Sie, bis Sie in allen PBS- und Wasser Küvetten gespült haben. Drücken Sie

die Halterung mit den Objektträgern mehrmals auf Papiertücher.

Methode B

Geben Sie die Halterung mit den Objektträgern 10 min. in die zweite PBS Küvette. Nehmen Sie die Halterung aus der Küvette und drücken Sie diese vorsichtig mehrmals auf Papiertücher. Geben Sie die Halterung in eine Küvette mit Aqua dest. und spülen die Objektträger durch vorsichtiges auf- und abbewegen der Halterung (ca. 10 mal).

Schritt III

Nehmen Sie die Objektträger aus der Halterung, lassen Sie die überschüssige Flüssigkeit auf Papiertüchern ablaufen und lassen sie (vorzugsweise aufrecht bei 37°C) trocknen.

Hinweis: Das Waschen der Objektträger ist kritisch und sollte sehr sorgfältig durchgeführt werden.

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass die Objektträger nach dem Waschen völlig trocken sind.

ZUGABE DES KONJUGATES

1. Geben Sie einen Tropfen (ca. 10 µl) anti-human IgA-FITC Konjugat auf die entsprechenden Felder der Objektträger durch vorsichtiges Aufsetzen der Tropfen auf die Objektträgerfelder.
Hinweis: Lassen Sie die Tropfen aus der Tropfflasche nicht frei auf die Objektträger fallen.
2. Legen Sie die Objektträger in eine feuchte Kammer und inkubieren Sie 30 Min. (max. 35 Min.) bei 37°C.
3. Waschen und trocknen Sie die Objektträger wie nach der Seruminkubation.

ZUGABE DES EINDECKMEDIUMS

Benutzen Sie eine im Kit enthaltene Tropfflasche für das Eindeckmedium. Legen Sie die Objektträger auf weiches Papier und verteilen Sie 4-5 Tropfen Eindeckmedium auf die Felder. Geben Sie ein Deckglas auf den Objektträger, vermeiden Sie Luftblasen. Nachdem sich das Eindeckmedium gleichmäßig verteilt hat, stellen Sie den Objektträger aufrecht, damit überschüssiges Eindeckmedium von dem Papier aufgesogen wird.

Falls notwendig, können die Objektträger im Dunkeln bei +2°C - +8°C für 24 Stunden aufbewahrt werden. Natürlich vermindert jede Lagerung die Intensität der Fluoreszenz und senkt konsequenterweise die Serumtiter.

MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG

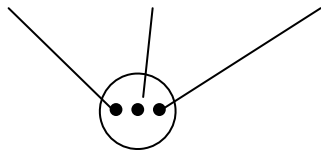
Vorgeschlagen für die Routine wird folgende Kombination: 10x Okular und 50x Objektiv mit Ölimmersion (500x Vergrößerung). Zur Bestätigung und zur genauen Untersuchung der Elementarkörper ist es angeraten ein 10x

Okular und ein 100x Objektiv (1000x Vergrößerung) zu benutzen.

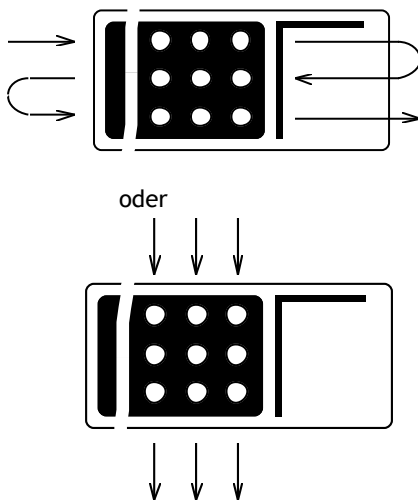
Fluoreszenzintensität und Titerhöhe variieren auf Grund der Variation der einzelnen Mikroskope auch bei gleicher Okular-Objektiv Kombination und auf Grund der subjektiven Beurteilung beim Mikroskopieren.

Wenn sich die mattierte Seite des Objektträgers auf der rechten Seite des Kreuztisches befindet, stellen sich die 3 Antigene unter dem Mikroskop folgendermaßen dar (da das Mikroskop in der Regel das Bild seitenverkehrt darstellt):

C. pneumoniae *C. trachomatis* *C. psittaci/LPS*



Es wird empfohlen, den Objektträger in folgender Reihenfolge mit der niedrigsten Verdünnung beginnend (z.B. 1:8) abzulesen



ERGEBNISSE

Positive und negative Reaktionen sind in dem Kapitel Interpretation der Ergebnisse näher erläutert. Beispiele finden Sie in der separaten Abbildung "Interpretation chart", diese ist im Kit enthalten.

POSITIVE REAKTION

C. pneumoniae

Bei einer positiven *C. pneumoniae* Reaktion sieht man fluoreszierende Elementarkörper, die alle die gleiche Grösse haben, die gleichmässig fluoreszieren, und rund oder "ringförmig" in Erscheinung treten (Fig.3) Befinden sich nur einige wenige fluoreszierende Partikeln in der Antigenauftragsstelle, spricht dies für eine unspezifische Reaktion. Die Dichte der Elementarkörper sollte wie in der positive Kontrolle sein.

Die positive Kontrolle zeigt die Intensität der Fluoreszenz, die als stark positiv anzusehen ist.

C. trachomatis

Positive Reaktionen mit *C. trachomatis* Antigen ähneln denen mit *C. pneumoniae* Antigen.

C. psittaci/LPS

Positive LPS Reaktionen ähneln nicht den spezifischen Chlamydia Reaktionen, da die Elementarkörperchen mit LPS überdeckt sind. Allerdings sieht man typische kleine fluoreszierende Partikel (Fig. 4).

NEGATIVE UND UNSPEZIFISCHE REAKTIONEN

Die Reaktion ist als negativ für *C.pneumoniae* anzusehen, wenn keine deutlichen Elementarkörper in den *C. pneumoniae* Auftragsstellen zu sehen sind (Fig. 5).

IgA Titer <1:8 sprechen dafür, dass der Patient keine Infektion hat.

Bei Chlamydien Infektionen werden zuerst LPS -Antikörper gebildet. Wurde eine Probe direkt zu Beginn der Erkrankung entnommen, enthält sie meist nur LPS- und noch keine spezies-spezifischen Antikörper.

Falls eine Serumprobe hohe Antikörpertiter gegen das LPS-Antigen enthält, kann die *C. psittaci/LPS* Auftragsstelle eine sehr stark positive Reaktion zeigen, während das *C. pneumoniae* und/oder das *C. trachomatis* Antigen grüne Fluoreszenz ohne Elementarkörper zeigen (Fig. 6). Diese Art der diffusen Fluoreszenz ist in den meisten Fällen auf LPS-Antigen zurückzuführen, das trotz reduzierter Aktivität mit Seren mit hohen LPS-Antikörpertitern reagiert. Manchmal verschwindet die grünliche LPS Reaktion mit steigender Serumverdünnung und Elementarkörper werden sichtbar. Falls nicht, sollte eine zweite Serumprobe nach 2-4 Wochen untersucht werden, um herauszufinden, ob spezifische Antikörper gebildet wurden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

C. PNEUMONIAE

Positive Titer:

- IgA \geq 1:8

Mit der Untersuchung gepaarter Serumproben im optimalen Zeitabstand (2-4 Wochen), ermöglicht der Mikro-IFT die Unterscheidung zwischen akuter und nicht -akuter Infektion basierend auf einer Serokonversion.

Akute Infektion:

- 4-facher Titeranstieg von IgA

Bei einer primären Infektion wird in der ersten Serumprobe eine IgM Antwort gefunden, während sich IgG und IgA Antikörper wesentlich langsamer entwickeln, besonders bei Patienten, die Antibiotika gegen Chlamydien Infektionen erhalten. Schnelle IgG und IgA Antwort sind ein typisches Merkmal einer Reinfektion.

Der Chlamydia pneumoniae IgG/IgM MIFT gibt zusätzliche Informationen über eine akute Chlamydia pneumoniae Infektion.

Nicht -akute Infektion:

Stabile oder rückgängige IgG und/oder IgA Titer mit negativer IgM Antwort können folgendes bedeuten: lang zurückliegende Infektion, kürzliche Infektion, Zustand nach Therapie, persistierende Infektion.

C. TRACHOMATIS

Die Chlamydia trachomatis Antigen - Auftragsstelle dient als Negative -Kontrolle, zur besseren Beurteilung seropositiver C. pneumoniae Befunde. Manche Proben können auch mit C. trachomatis Antigen reagieren. Diese Antikörper haben jedoch keine klinische Bedeutung, wenn es sich um lange persistierende Antikörper handelt.

C. PSITTACI

Die C. psittaci Antigen - Auftragsstelle, welche LPS enthält, dient als Kontrolle für Seropositivität gegen Chlamydien Lipopolysaccharid (LPS).

INTERPRETATIONSANLEITUNG

	Antigen		
	C. pneumoniae	C. trachomatis	C. psittaci / LPS
C.pneumoniae Infektion	+	kein oder gleichbleibendes IgG oder IgA	+/-
Verdacht auf C. trachomatis Infektion	kein oder gleichbleibendes IgG oder IgA	+	+/-
Frühe Chlamydia Infektion o. Verdacht auf C. psittaci Inf.	kein oder gleichbleibendes IgG oder IgA	kein oder gleichbleibendes IgG oder IgA	+

TESTCHARAKTERISTIKA

EVALUIERUNGSERGEBNISSE

Gepaart (n = 16) und einzelne (n = 99) Serumproben von 115 Patienten mit Verdacht auf Chlamydien Infektion wurden mit dem Labsystems Diagnostics Chlamydia pneumoniae IgG/IgM und IgA Mikro-IFT und mit einem nicht kommerziell erhältlichen Chlamydia IgG, IgM, IgA Mikro-IFT untersucht.

Der nicht kommerziell erhältliche Mikro-IFT wird in der Abteilung für Virologie des Haartmann Instituts der Universität Helsinki, Finnland verwendet und hat ein ähnliches Testprinzip wie der Labsystems Diagnostics Mikro-IFT, außer dass als Antigen unbehandelte Chlamydien pneumoniae Elementarkörperchen verwendet werden.

Ein mindestens vierfacher Titeranstieg (IgG, IgA, IgM) und/oder ein positives IgM Testergebnis (IgM Titer > 1:16) mit dem nicht kommerziellen Mikro-IFT galten als Hinweis auf eine akute C. pneumoniae Infektion.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Evaluierungsergebnisse des Labsystems Diagnostics Chlamydia pneumonia Mikro-IFT

		Labsystems Diagnostics' Micro-IFT		
		+	-	N
Nicht kommerzieller Mikro-IFT	+	30 *)	0	30
	-	3 **)	82 **)	85
	N	33	82	115

*) 28 dieser Proben waren IgM positiv in beiden Assays. Einer dieser IgM positiven Fälle zeigt zusätzlich einen vierfach - IgG Titeranstieg in beiden Assays. 6 von diesen IgM positiven Proben hatten hohe IgG Titer ($\geq 1:512$) in der Vergleichsmethode. Die IgG Titer dieser Proben im Labsystems Diagnostics C. pneumoniae Mikro-IFT waren wie folgt: $\geq 1:512$ (n=2), 1:256 (n=2), 1:128 (n=1) und 1:32 (n=1).

2 dieser Proben wurden aufgrund eines vierfachen - Titeranstiegs im IgA in beiden Testsystemen als positiv bewertet.

**) 3 Probe, die positiv im Labsystems Diagnostics Test reagierten (IgG $\geq 1:512$) und 2 Proben von 82 negativen Proben reagierten in dem nicht kommerziellen Test nur mit Verdacht positiv (IgG $\geq 1:512$)

Gepaarte (n=3) und einzelne (n=29) Serumproben von 32 Patienten mit serologisch diagnostizierter oder mit Verdacht auf Chlamydia pneumoniae Infektion wurden mit dem Labsystems Diagnostics Chlamydia pneumoniae IgG/IgM und IgA Mikro-IFT und mit einem anderen kommerziell erhältlichen Mikro-IFT zur Bestimmung von Chlamydia pneumoniae IgG, IgM oder IgA Antikörpern in Humanserum untersucht.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Evaluierungsergebnisse des Labsystems Diagnostics Chlamydia pneumoniae Mikro-IFT

		Labsystems Diagnostics' Micro-IFT		
		+	-	N
Kommerzieller Mikro-IFT	+	25 *)	0	25
	-	2	5	7
	N	27	5	32

*) 25 dieser Proben waren IgM positiv in beiden Assays. Einer dieser IgM positiven Fälle zeigt zusätzlich einen vierfach- IgG Titeranstieg in beiden Assays. 2 dieser IgM positiven Seren hatten außerdem hohe IgG Titer (> 1:512) im Labsystems Diagnostics C. pneumoniae Mikro -IFT; die IgG Titer dieser Proben in den kommerziell erhältlichen C. pneumoniae Mikro-IFT waren wie folgt: $\geq 1:512$ (n =1), 1:256 (n=1).

Der Labsystems Diagnostics Chlamydia pneumoniae IgM Mikro-IFT wurde ebenfalls gegen einen kommerziellen Test durch ein anderes Labor evaluiert. Die Sensitivität des Labsystems Diagnostics IgM Test war 86% (6/7) im Vergleich zu 57% (4/7) beim Wettbewerbstest. Die Übereinstimmung

des Labsystems Diagnostics IgM Test war 97% im Vergleich zu 74% beim Wettbewerb.

INTRA-ASSAY REPRODUZIERBARKEIT

Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde anhand von 4 Seren mit variablen Chlamydia Antikörpertitern getestet. Jedes Serum wurde 10 mal individuell verdünnt. Die gesamte Intra-Assay Reproduzierbarkeit war ausgezeichnet:

- Im Chlamydia pneumoniae IgG MICRO-IF Test in 10 parallelen Ansätzen erzielte jedes der 4 Seren das gleiche Ergebnis, das ergibt eine Reproduzierbarkeit von 100 % (40/40)
- Im Chlamydia pneumoniae IgM MICRO-IF Test in 10 parallelen Ansätzen erzielte jedes der 4 Seren das gleiche Ergebnis, das ergibt eine Reproduzierbarkeit von 100 % (40/40)
- Im Chlamydia pneumoniae IgA MICRO-IF Test in 10 parallelen Ansätzen erzielte jedes der 4 Seren das gleiche Ergebnis, das ergibt eine Reproduzierbarkeit von 100 % (40/40)

INTER-ASSAY REPRODUZIERBARKEIT

Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurde mit 4 Proben mit variablen Chlamydia spezifischen Antikörpertitern getestet. Die Proben wurden in 10 aufeinanderfolgenden Läufen durch 3 verschiedene Personen getestet. Jeder Testlauf wurde in 4-fach Bestimmung durchgeführt. Für jede Vierfachbestimmung wurde die Serumprobe separat hergestellt. Die mikroskopische Ablesung erfolgte durch eine Person.

- Im Chlamydia pneumoniae IgG MICRO-IF Test erzielten von 160 Proben 144 (90 %) in verschiedenen Läufen das gleiche ergebnis.
- Im Chlamydia pneumoniae IgM MICRO-IF Test erzielten von 160 Proben 152 (95 %) in verschiedenen Läufen das gleiche ergebnis
- Im Chlamydia pneumoniae IgA MICRO-IF Test erzielten von 160 Proben 147 (92 %) in verschiedenen Läufen das gleiche ergebnis

LOT-TO-LOT REPRODUZIERBARKEIT

Die Testung der Lot-to-Lot Reproduzierbarkeit erfolgte unter Verwendung von Proben, welche zum Endpunkt von Chlamydia pneumoniae IgG, IgA und IgM Antikörper titriert wurden.

- Im IgG MICRO-IF Test lagen der Titer der Proben in 20 von 23 Lots (87 %) innerhalb der gleichen Verdünnung.
- Im IgM MICRO-IF Test lagen der Titer der Proben in 40 von 45 Lots (89 %) innerhalb der gleichen Verdünnung.
- Im IgA MICRO-IF Test lagen der Titer der Proben in 39 von 44 Lots (89 %) innerhalb der gleichen Verdünnung.

KREUZREAKTIONEN

Es wurden keine Kreuzreaktionen mit den folgenden Mikroorganismen festgestellt:

- Cytomegalovirus
- Epstein-Barr virus
- Toxoplasma gondii*
- Bordetella pertussis*
- Mycoplasma pneumoniae*

BEGRENZUNG DES TESTSYSTEMS

- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer *Chlamydia pneumoniae* Infektion nicht komplett aus.

- C. pneumoniae spezifische IgG Antikörper können den IgA Antikörper Nachweis stören. Die Benutzung eines IgG Absorbens (z.B. Labsystems Diagnostics IgG blocking reagent, cat.no 6106020) macht die IgA Reaktion stärker und einfacher zum ablesen.
- Lange Lagerung des Serums (über 1 Jahr in gefrorenem Zustand), Hitzeinaktivierung und wiederholtes Auftauen und Einfrieren kann zur Verringerung der Antikörper führen.
- Da die mikroskopische Auswertung ist subjektiv, sollte die Objektträger durch eine erfahrene Person abgelest werden.
- Die Diagnose einer *Chlamydia trachomatis* oder einer *Chlamydia psittaci* Infektion sollte nicht allein mit diesem Test erstellt werden. Der Test kann lediglich als Hinweis dienen.
- Die Testergebnisse sollten immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild und anderen Laborparametern gesehen werden.

FEHLERSUCHE

Die Fluoreszenz erscheint zu gering.

- Verschließen Sie die Objektträger mit Trockenbeutel gut in die Folie, da Feuchtigkeit die Reaktion beeinträchtigen kann
- Zu kurze Inkubation des Konjugates führt zu geringer Fluoreszenz. Stellen Sie einen Laborwecker nachdem Sie den letzten Objektträger pipettiert haben.
- Das Konjugat ist lichtempfindlich, vermeiden Sie daher nach Zugabe des Konjugates Lichteinfluß.
- Verwenden Sie nur das Eindeckmedium aus dem Kit.
- Überprüfen Sie das Mikroskop.

Teile des Antigens sind nicht mehr vorhanden.

- Vermeiden Sie Feuchtigkeit. Stellen Sie sicher, dass die Objektträger auf Raumtemperatur erwärmt werden, bevor ihn aus der Folie nehmen. Die Objektträgerfolie muss sofort mit Trockenbeutel wieder fest verschlossen werden
- Stellen Sie sicher, dass die Antigenauftragsstelle während des Pipettierens nicht berührt wird, und das Deckglas nach Eindecken des Objektträgers nicht verschoben wird.
- Waschen Sie wie unter Methode B beschrieben.

Das Konjugat verläuft über den Objektträger.

- Überprüfen Sie, dass die Objektträger, auch die rote Oberfläche, nach dem Waschen völlig trocken sind.

Die Objektträger erscheinen „schmutzig“ mit einem grünlichen Schleier.

- Der Grund hierfür ist meist unzureichendes Waschen nach Serum - oder der Konjugatinkubation. Der Waschvorgang kann verbessert werden, indem man die Objektträger 10 Minuten in der letzten PBS - Portion stehen läßt.

Fluoreszierende (keine spezifischen) Partikel sind auf dem Objektträger zu sehen.

- Hierbei handelt es sich meist um Konjugatreste, die nicht vollständig durch Waschen entfernt wurden.

Das mikroskopische Bild läßt sich nicht scharf stellen.

-Es befinden sich Luftblasen unter dem Deckglas.

REFERENCES:

1. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in respiratory tract infections. N Engl J Med 1986; 315:161-168.
2. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. Chest 1989; 95:664-669.
3. Kleemola M, Saikku P, Vasakorpi R, Wang SP and Grayston JT. Epidemics of pneumonia caused by TWAR. J Infect Dis 1988;157:230-236.
4. Grayston JT, Aldous MB, Easton A, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA et al. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. J Infect Dis 1993; 168:1231-1235.
5. Hahn DL, Dodge RW and Golubjatnikov R. Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis and adult-onset asthma. JAMA 1991;266:225-230.
6. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Mäkelä PH et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 1988;2:983-986.
7. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmäki E, Ekman MR, Manninen V et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. Ann Int Med 1992;116:272-278.
8. Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH and Wang SP. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J Infect Dis 1990;161:618-625.
9. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, and Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin Microbiol Rev 1995; 8:451-461.
10. Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkänen J, Naukkarinen A and Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* IgG antibody prevalence in south-Western and Eastern Finland in 1982 and 1987. Int J Epid 1994; 23:176-184.
11. Tuuminen T, Varjo S, Ingman H, Weber T, Oksi J and Viljanen M. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays (EIAs). Clin Diagn Lab. Immunol. 2000; 7:734-738.
12. Ekman MR, Leinonen M, Syrjälä H, Linnanmäki E, Kujala P, Saikku P. Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia during an epidemic in Finland. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993; 12: 756-760
13. Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* and Atherosclerosis - an Update. Scand J Infect Dis Suppl 1997; 104: 53-56.
14. Sarov I, Sarov B, Lunefeld E, Hagai Z, Chaim W and Figura B. The significance of Chlamydia-specific serum IgA antibodies in *Chlamydia trachomatis* infections. 1st Proc Eur Soc Chlamydia Res. Stockholm: Almquist & Wiksell International 1988: 234-238.
15. Chaim W, Sarov B, Sarov I, Piura B, Cohen A and Insler V. Serum IgG and IgA antibodies to chlamydia in ectopic pregnancies. Contraception 1989; 40: 59-71.

16. Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and /or lead azides. Dept of H.E.W., N.I.O.S.H., Rockville, Maryland, 1976.
17. NCCLS Document M29-T2 (1991). Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids and tissue. Vol. 11, No 14.
18. NCCLS Document I17-P (1991). Protection of laboratory workers from instrument biohazards. Vol. 11, No 15.
19. Spire B, Montagnier L, Barre-Sinoussi F and Chermann JC. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. Lancet 1984; October 20: 899-901.
20. Martin LS, McDougal JS and Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus. J Infect Dis 1985; 152: 400-403.

RELATED PRODUCTS / PRODUITS AFFILIÉS / PRODUCTOS RELACIONADOS/ANDERE PRODUKTE

Product number	Product description
61 08 380	C. pneumoniae IgG/IgM MIF (20x21 well slides)
61 08 382	C. pneumoniae IgG/IgM MIF (20x12 well slides)
61 08 390	C. pneumoniae IgA MIF (20x21 well slides)
61 08 392	C. pneumoniae IgA MIF (20x12 well slides)
61 08 384	C.pneumoniae MIF slides(5x21 wells)
61 11 300	Chlamydia pneumoniae IgG EIA
61 11 310	Chlamydia pneumoniae IgA EIA
61 11 320	Chlamydia pneumoniae IgM EIA
61 06 020	IgG blocking reagent

**SYMBOLS USED / SYMBOLES UTILISÉS /
GEBRAUCHTE SYMBOLEN / SIMBOLI USATI**



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



Manufacturer
Fabricant
Fabricante
Hersteller
Fabbricante



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



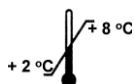
Contains sufficient for < n > tests
Pour n dosages
Para n determinaciones
Für n Bestimmungen
Per n determinazioni



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