

IVD

Gebrauchsanweisung (Deutsch)

1 Zweckbestimmung

Der recomWell Chlamydia pneumoniae IgG, IgM und IgA ist ein qualitativer (IgG, IgA, IgM) bzw. quantitativer (IgG, IgA) In-vitro-Test zum Nachweis und zur Identifizierung von IgG-, IgM- oder IgA-Antikörpern gegen *Chlamydia pneumoniae* in humanem Serum oder Plasma. Beim recomWell Chlamydia pneumoniae IgG, IgM bzw. IgA handelt es sich um einen indirekten ELISA. Der Test kann manuell und automatisiert abgearbeitet werden.

2 Anwendungsbereich

Mit dem recomWell Chlamydia pneumoniae werden IgG-, IgM- und IgA-Antikörper gegen Proteine der äußeren Membran des Erregers *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen. Infektionen mit dem Erreger werden aerogen übertragen und können zu Erkrankungen der oberen Atemwege, der Bronchien und der Lunge führen. Auch der Zusammenhang mit anderen Erkrankungen wie z.B. der koronaren Herzerkrankung (KHK) ist bekannt. Meist verläuft die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* asymptomatisch oder mit geringer Symptomatik. Die Prävalenz des Erregers in der erwachsenen Bevölkerung liegt bei ca. 50%. IgM-Antikörper, gefolgt von IgA-Antikörpern, treten innerhalb von 2 bis 4 Wochen, IgG-Antikörper innerhalb von 6-8 Wochen nach Erstinfektion auf. IgG- und IgA-Antikörper können auch bei Reinfektionen auftreten und für lange Zeit persistieren. Der recomWell Chlamydia pneumoniae kann zum Nachweis des Serostatus oder zur Unterstützung der Diagnostik einer akuten Infektion genutzt werden.

3 Testprinzip

Die Mikrotiterplatten des Nachweistests sind mit einem aufgereinigten, nativen Komplex von Proteinen der äußeren Membran von *Chlamydia pneumoniae* Elementar- und Retikularkörperchen beschichtet. Verdünnte Serum- oder Plasmaproben werden in den Kavitäten der Mikrotiterplatten inkubiert, wobei sich spezifische Antikörper an die Erregerantigene auf den Bodenflächen der Kavitäten anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend gewaschen. In einem zweiten Schritt werden anti-human Immunglobulin-Antikörper (IgG, IgM bzw. IgA), die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, in den Kavitäten inkubiert. Nicht gebundene Konjugat-Antikörper werden anschließend gewaschen. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat, färbt sich die Färbesubstratlösung entsprechend der Menge der gebundenen anti-*Chlamydia pneumoniae* IgG-, IgM- oder IgA- Antikörper. Die Intensität der Färbung kann mit Hilfe eines Photometers gemessen werden und erlaubt eine Aussage über die Konzentration der anti-*Chlamydia pneumoniae*-Antikörper in der Probe.

4 Reagenzien

4.1 Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen. Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF 10 X	100 ml Waschpuffer (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, Detergenz. Konservierungsmittel: MIT (0,01%) und Oxypryion (0,1%)
DILUBUF	125 ml Verdünnungspuffer (gebrauchsfertig) Enthält Protein, Detergenz und blauen Farbstoff. Konservierungsmittel: MIT (0,01%) und Oxypryion (0,1%)
SUBS TMB	12 ml Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) (gebrauchsfertig)
SOLN STOP	12 ml Stopplösung 24,9% Phosphorsäure (H ₃ PO ₄) (gebrauchsfertig)
INSTRU	1 Gebrauchsanweisung
EVFORM	1 Auswertebogen
TAPE	2 Stück Abdeckfolien

recomWell Chlamydia pneumoniae IgG enthält zusätzlich:

MTP	12x8 Kavitäten -Mikrotiterplatte (Riegel rot markiert) Beschichtet mit spezifischen <i>Chlamydia pneumoniae</i> Antigenen im Vakuum-Druckverschlussbeutel.
CONTROL + IgG	450 µl Positive Kontrolle (Violette Verschlusskappe), Kaninchenserum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONTROL ± IgG	450 µl Cutoff Kontrolle (Gelbe Verschlusskappe), Kaninchenserum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONTROL - IgG	450 µl Negative Kontrolle (Weiß e Verschlusskappe), humanes Serum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONJ IgG	500 µl Anti-human IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege, Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat aus Schwein (101-fach konzentriert , Rote Verschlusskappe) Konservierungsmittel: Thimerosal (<0,02%), MIT (<0,01%) und Chlorazetamid (<0,1%)

recomWell Chlamydia pneumoniae IgM enthält zusätzlich:

MTP	12x8 Kavitäten -Mikrotiterplatte (Riegel grün markiert) Beschichtet mit spezifischen <i>Chlamydia pneumoniae</i> Antigenen im Vakuum-Druckverschlussbeutel.
CONTROL + IgM	450 µl Positive Kontrolle (Schwarze Verschlusskappe), Kaninchenserum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONTROL ± IgM	450 µl Cutoff Kontrolle (Farblos e Verschlusskappe), Kaninchenserum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONTROL - IgM	450 µl Negative Kontrolle (Weiß e Verschlusskappe), humanes Serum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONJ IgM	500 µl Anti-human IgM-Peroxidase-Konjugat aus Ziege, Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat aus Schwein (101-fach konzentriert , Grüne Verschlusskappe), Konservierungsmittel: Thimerosal (<0,02%), MIT (<0,01%) und Chlorazetamid (<0,1%)

recomWell Chlamydia pneumoniae IgA enthält zusätzlich:

MTP	12x8 Kavitäten -Mikrotiterplatte (Riegel blau markiert) Beschichtet mit spezifischen <i>Chlamydia pneumoniae</i> Antigenen im Vakuum-Druckverschlussbeutel.
CONTROL + IgA	450 µl Positive Kontrolle (Braune Verschlusskappe), Kaninchenserum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONTROL ± IgA	450 µl Cutoff Kontrolle (Orange Verschlusskappe), Kaninchenserum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONTROL - IgA	450 µl Negative Kontrolle (Weiß e Verschlusskappe), humanes Serum, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypryion (0,1%)
CONJ IgA	500 µl Anti-human IgA-Peroxidase-Konjugat aus Ziege, Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat aus Schwein (101-fach konzentriert , Blaue Verschlusskappe), Konservierungsmittel: Thimerosal (<0,02%), MIT (<0,01%) und Chlorazetamid (<0,1%)

4.2 Zusätzlich benötigte Reagenzien, Materialien und Geräte

- Deionisiertes Wasser
- Teströhrchen
- Vortex-Mixer oder andere Rotatoren
- 8-Kanalpipette oder Washer mit Pumpe
- Saubere Messzylinder, 50 ml und 1000 ml
- Mikropipetten mit Einwegspitzen, 10 µl und 1000 µl
- 10 ml Pipette oder Dispenser
- Inkubationsschrank 37°C
- Mikrotiterplatten-Photometer
- Timer
- Einweg-Schutzhandschuhe
- Abfallbehälter für Biogefahrstoffe

5 Haltbarkeitsdauer und Handhabung

- ☞ Reagenzien vor und nach Gebrauch bei +2°C bis +8°C lagern, **nicht einfrieren**.
- ☞ Vor Testbeginn alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (+18°C bis +25°C) temperieren.
- ☞ Die Komponenten Verdünnungspuffer, Waschpuffer, Substrat und Stopplösung für die recomWell-Teste können parameter- und chargenübergreifend eingesetzt werden. Dabei ist die Haltbarkeit dieser Komponenten zu beachten.
- ☞ Die Kontrollseren und Konjugate sind chargengebunden und dürfen nicht parameter- oder chargenübergreifend eingesetzt werden.
- ☞ Vor Gebrauch die konzentrierten Konjugate, Kontrollen und Patientenproben gut durchmischen. Schaumbildung vermeiden.
- ☞ Alle MIKROGEN Mikrotiterplatten sind mit Break-a-part-Riegeln ausgestattet.
- ☞ Die Abdeckfolien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt.
- ☞ Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.
- ☞ Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen. Insbesondere die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich.
- ☞ Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.
- ☞ Bei substanzialen Änderungen am Produkt bzw. der Anwendungsvorschrift durch den Anwender kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.
- ☞ Kreuzkontamination der Patientenproben oder Konjugate kann zu falschen Testergebnissen führen. Fügen Sie Patientenproben und Konjugatlösung sorgfältig zu. Achten Sie darauf, dass Inkubationslösungen nicht in andere Kavitäten verschleppt werden.
- ☞ Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

6 Warnungen und Sicherheitsvorkehrungen

- ☞ Nur für die In-vitro-Diagnostik verwenden.
- ☞ Sämtliche Blutprodukte müssen als potenziell infektiös behandelt werden.
- ☞ Die Mikrotiterkavitäten wurden mit inaktivierten Ganzzelllysat-, bakteriellen oder viralen Antigenen beschichtet.
- ☞ Nach der Zugabe von Patienten- oder Kontrollmaterial müssen die Mikrotiterkavitäten als potenziell infektiös betrachtet und entsprechend behandelt werden.
- ☞ Für die Herstellung von Kontrollmaterial wird Blut von Spendern verwendet, bei denen keine Antikörper gegen HIV 1/2, HCV und kein HBs-Antigen nachgewiesen wurden. Da trotzdem eine Infektion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muss das Kontrollmaterial mit der gleichen Sorgfalt behandelt werden wie eine Patientenprobe.
- ☞ Während des gesamten Testverfahrens müssen geeignete Einweg-Handschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate sowie Wasch- und Verdünnungspuffer enthalten die antimikrobiellen Mittel und Konservierungsstoffe Thimerosal, MIT (Methylisothiazolon), Oxypyron und Chlorazetamid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Phosphorsäure ist reizend. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten unbedingt vermeiden.
- ☞ Alle verworfenen Flüssigkeiten müssen gesammelt werden. Alle Sammelbehälter müssen geeignete Desinfektionsmittel zur Inaktivierung humanpathogener Erreger enthalten. Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder entsprechend den Hygienevorschriften entsorgt werden. Die Konzentrationsangaben und Inkubationszeiten der Hersteller müssen beachtet werden.
- ☞ Mikrotiterkavitäten nur einmal verwenden.
- ☞ Ersetzen oder mischen Sie die Reagenzien nicht mit Reagenzien anderer Hersteller.
- ☞ Vor Durchführung des Tests die gesamte Gebrauchsanweisung durchlesen und sorgfältig befolgen. Abweichungen vom in der Gebrauchsanweisung aufgeführten Testprotokoll können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

7 Probenentnahme und Vorbereitung

7.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma (EDTA, Citrat, Heparin, CPD) sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt werden muss, um eine Hämolyse zu vermeiden. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen.

Die Verwendung von hitzeinaktivierten, ikterischen, hämolytischen, lipämischen oder trüben Proben wird nicht empfohlen.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei +2°C bis +8°C aufbewahrt werden.

Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20°C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen. Mehr als 3 Tiefgefrier- und Auftau-Zyklen sollten vermieden werden.

7.2 Herstellung der Lösungen

Die Nachweisreagenzien reichen für 96 Bestimmungen. Die unten genannten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Bearbeitung von einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten. Bei der Verwendung von mehreren Mikrotiterplattenstreifen gleichzeitig müssen die angegebenen Mengen jeweils mit der Anzahl der verwendeten Mikrotiterplattenstreifen multipliziert werden. Gerätespezifisches Totvolumen muss berücksichtigt werden. Verdünnungspuffer, Substrat- und Stopplösung sind gebrauchsfertig.

7.2.1 Herstellung des Waschpuffers

Das Waschpuffer-Konzentrat wird **1 + 9** mit H₂O deion. verdünnt. Pro Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten werden 5 ml Konzentrat mit 45 ml H₂O deion. gemischt. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann vier Wochen bei +2°C - +8°C oder eine Woche bei Raumtemperatur gelagert werden.

7.2.2 Herstellung der Konjugatlösung

Pro Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten wird 1 ml Verdünnungspuffer mit je 10 µl IgG-Peroxidase-Konjugat (Rote Verschlusskappe) oder 10 µl IgM-Peroxidase-Konjugat (Grüne Verschlusskappe) oder 10 µl IgA-Peroxidase-Konjugat (Blaue Verschlusskappe) in einem sauberen Gefäß versetzt und gut gemischt (Verdünnung **1 + 100**). Die Konjugatlösung ist **kurz vor Gebrauch** herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

8 Testverfahren

Nr.	Durchführung	Anmerkung
1	Alle Reagenzien vor Testbeginn für mindestens 30 Minuten auf +18°C bis +25°C (Raumtemperatur) temperieren.	Zur Vermeidung von Kondenswasserbildung in der Mikrotiterplatte muss diese im verschlossenen Beutel auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach der Entnahme der benötigten Riegel soll die Platte im Beutel wieder verschlossen und im Kühlschrank gelagert werden. Vor Gebrauch die Kontrollseren und Patientenproben sowie die konzentrierten Konjugate gut durchmischen und soweit möglich anschließend kurz abzentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden der Gefäße zu sammeln.
2	<u>Proben und Kontrollen vorbereiten</u> Zu je 1 ml Verdünnungspuffer 10 µl Probe bzw. Kontrolle pipettieren und gut mischen (Verdünnung 1 + 100).	Die Verdünnung der Proben und Kontrollen muss immer unmittelbar vor der Testdurchführung erfolgen. Bei jedem Testansatz müssen alle Kontrollen mitgeführt werden, die ebenso wie die Patientenproben verdünnt werden.
3	<u>Probeninkubation</u> 100 µl verdünnte Probe bzw. verdünnte Kontrolle pro Kavität pipettieren und 1 Stunde bei +37°C inkubieren.	Von der Negativkontrolle, Positivkontrolle und den Patientenproben mindestens einen Wert anlegen. Die Cutoff-Kontrolle muss doppelt angelegt werden. Vorzugsweise je eine Cutoff-Kontrolle am Anfang der Serie und am Ende der Serie pipettieren. Mikrotiterplatte bei manueller Abarbeitung sorgfältig mit ungebrauchter Abdeckfolie abkleben. Inkubationsschrank +37°C verwenden.

4	<u>Waschen</u>	Es wird empfohlen, diesen Schritt mit einem entsprechenden ELISA-Waschgerät durchzuführen. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass der Waschpuffer zwischen den Waschschritten vollständig entfernt wird.
a)	Abdeckfolie vorsichtig abziehen.	
b)	Kavitäten vollständig leeren.	Absaugen oder ausschütten und ausklopfen.
c)	Kavitäten mit je 300 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer füllen (siehe 7.2.1) → 8.4b	Waschschritte 8.4b und 8.4c insgesamt viermal durchführen.
5	<u>Inkubation mit Konjugat</u> 100 µl verdünnte Konjugatlösung (siehe 7.2.2) zugeben und 30 Minuten bei +37°C inkubieren.	Die Mikrotiterplatte wird bei manueller Abarbeitung sorgfältig mit ungebrauchter Abdeckfolie abgeklebt.
6	<u>Waschen</u> (siehe 8.4b und 8.4c)	Waschschritte insgesamt viermal durchführen.
7	<u>Substratreaktion</u> 100 µl gebrauchsfertige Substratlösung pro Kavität pipettieren und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Zeit wird ab Pipettieren der ersten Kavität gerechnet.	Abkleben der Platte ist nicht erforderlich. Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen.
8	<u>Abstoppen der Reaktion</u> 100 µl gebrauchsfertige Stopplösung pro Kavität hinzu pipettieren.	Vor Zugabe der Stopplösung wird die Substratlösung nicht entfernt! Dasselbe Pipettierschema wie beim Pipettieren der Substratlösung einhalten.
9	<u>Messung der Extinktionen</u> Die Extinktionen der einzelnen Kavitäten werden in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 620 nm (620 bis 650 nm zulässig) gemessen.	Der Nullabgleich erfolgt gegen Luft. Die Messung muss innerhalb von 60 Minuten nach Abstoppen der Reaktion erfolgen.
Achtung! Inkubationslösungen dürfen nicht in andere Kavitäten verschleppt werden. Insbesondere beim Abziehen und Anbringen der Abdeckfolie sind Spritzer zu vermeiden.		

9 Ergebnisse

9.1 Auswertung

Cutoff (Grenzwert) = Von den Extinktionswerten der beiden Cutoff-Kontrollen (am Anfang und am Ende der Serie) wird der Mittelwert gebildet.

9.1.1 Qualitative Auswertung

Graubereich	untere Grenze = Cutoff obere Grenze = Cutoff + 20% (Cutoff x 1,2)
Negativ	Proben mit Extinktionswerten unterhalb des Graubereiches
Grenzwertig	Proben mit Extinktionswerten im Graubereich
Positiv	Proben mit Extinktionswerten oberhalb des Graubereiches

9.1.2 Quantitative Auswertung

Den Extinktionswerten wird mit Hilfe einer Formel die entsprechende Antikörperaktivität in **Units pro ml** zugeordnet. Bei der Messeinheit U/ml handelt es sich um eine arbiträre Einheit, die keine direkten Rückschlüsse auf (internationale) Referenzwerte erlaubt.

U/ml Probe	(Extinktion Probe / Extinktion Cutoff) x 20
Graubereich	untere Grenze = 20 U/ml obere Grenze = 24 U/ml
Negativ	U/ml Probe < 20
Grenzwertig	20 ≤ U/ml Probe ≤ 24
Positiv	U/ml Probe > 24

Proben mit grenzwertigem Testergebnis sollten innerhalb von zwei bis vier Wochen erneut getestet werden. Sind sie nach dem zweiten Test wiederum grenzwertig, empfiehlt es sich nach einiger Zeit eine weitere Probe zu nehmen und zu testen.

Die Linearität des Tests konnte bei der Evaluierung innerhalb des folgenden Messbereiches nachgewiesen werden:

IgG: 20 U/ml bis 65 U/ml ($R^2 = 0,95$)

IgA: 20 U/ml bis 56 U/ml ($R^2 = 0,95$)

IgM: kein Serum > 35 U/ml unter 1000 Pneumonie-Verdachtsseren der Leistungsbewertung gefunden; keine Linearitätsermittlung möglich.

Bei einer Extinktion $\geq 3,0$ oder bei einem Messwert oberhalb dieses linearen Bereiches, sollte entweder das Resultat für IgG mit > 65 U/ml oder für IgA mit > 56 U/ml angegeben werden oder die Probe verdünnt und erneut getestet werden. Wir empfehlen zunächst eine Endverdünnung von 1:500 und ggf. weitere Verdünnungsschritte.

9.1.3 Validierung - Qualitätskontrolle

Der Test ist unter folgenden Bedingungen auswertbar:

- Die einzelnen Extinktionswerte der Doppelbestimmung der Cutoff-Kontrolle weichen nicht mehr als 20% von ihrem Mittelwert ab.
- Extinktion negative Kontrolle $\leq 0,150$
- Extinktion Cutoff-Kontrolle – Extinktion negative Kontrolle $\geq 0,050$ ($E_{\text{Cutoff}} - E_{\text{neg. Kontr.}} \geq 0,050$)
- Extinktion positive Kontrolle > Extinktion Cutoff-Kontrolle ($E_{\text{pos. Kontr.}} > E_{\text{Cutoff}}$)

Die Kontrollen dienen der Validierung der Testergebnisse gemäß diesem Kapitel. Die Bestimmung spezifischer Antikörper relativ zur Cutoff-Kontrolle in U/ml erhöht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen mit einbezogen werden. Eine Auswertung der positiven Kontrolle und der negativen Kontrolle ist für die Validierung des Tests nicht notwendig. Bei Bedarf kann sie jedoch zum Zweck der internen Qualitätskontrolle durchgeführt werden. In diesem Fall sollten die Ergebnisse in dem im Analysenzertifikat oder auf dem Etikett ausgewiesenen Zielwertbereich liegen.

9.2 Testinterpretation

Mögliche Ergebnisse			Interpretation
IgM	IgA	IgG	
+	+	+	Serologischer Hinweis auf eine akute Infektion.
+	+	-	Serologischer Hinweis auf eine akute Infektion. Überprüfung des IgG-Status nach zwei bis vier Wochen.
+	-	+	Serologischer Hinweis auf eine akute Infektion.
-	+	+	Serologischer Hinweis auf eine akute Infektion.
+	-	-	Serologischer Hinweis auf ein frühes Infektionsstadium. Überprüfung des IgM, IgA und IgG nach zwei bis vier Wochen.
-	+	-	Serologischer Hinweis auf ein frühes Infektionsstadium oder solitär persistierendes IgA. Überprüfung des IgM, IgA und IgG nach zwei bis vier Wochen.
-	-	+	Serologischer Hinweis auf eine zurückliegende oder bestehende Infektion. Bei klinischem Verdacht nach zwei bis vier Wochen auf IgA und IgG überprüfen.
-	-	-	Kein serologischer Hinweis auf eine bestehende oder abgelaufene Infektion. Bei klinischem Verdacht nach zwei bis vier Wochen auf IgM, IgA und IgG überprüfen.

Eine akute Chlamydia pneumoniae-Infektion ist wahrscheinlich, wenn der IgG-Titer im Verlauf der Infektion deutlich ansteigt.

10 Grenzen der Methode, Einschränkungen

- Serologische Testergebnisse sind immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu sehen. Therapeutische Konsequenzen der serologischen Befundung sind im Zusammenhang mit den klinischen Daten zu ziehen.
- Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Chlamydia pneumoniae-Infektion nicht aus. Bei klinischem Verdacht auf eine Infektion mit Chlamydia pneumoniae und negativem serologischen Befund sollte nach 2 Wochen eine weitere Probenentnahme und Testung erfolgen.
- Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn die Serumproben sehr früh nach einer Infektion gewonnen worden sind.
- Ein positives recomWell Chlamydia pneumoniae-Testresultat bedeutet nicht in jedem Fall, dass ein aktives Krankheitsgeschehen vorliegt.
- Zur Diagnose einer Chlamydia pneumoniae-Infektion sind neben den Labormesswerten in jedem Fall auch das klinische Bild und ggf. die Anamnese mit einzubeziehen.
- Für die Beurteilung des Chlamydia pneumoniae-Immunitätsstatus sollten immer die Ergebnisse des IgM-, IgA- und IgG-Nachweises zusammen betrachtet werden.
- Wir empfehlen generell, positive und grenzwertige ELISA-Resultate in einem Bestätigungstest nachzuprüfen.

11 Leistungsmerkmale

11.1 Seroprävalenz von Chlamydia pneumoniae-Antikörpern bei Blutspendern

n = 200	recomWell Chlamydia pneumoniae IgG	recomWell Chlamydia pneumoniae IgA	recomWell Chlamydia pneumoniae IgM
positiv	69	5	0
grenzwertig	10	4	0
negativ	121	191	200
Seroprävalenz (positiv und grenzwertig)	39,5%	4,5%	0%

Herkunft der Proben: Bayerisches Rotes Kreuz

11.2 Diagnostische Leistung (positive und negative Übereinstimmung mit MIF (MI, MC Phoon 2011))

IgG:

Ein Routinekollektiv von 81 Verdachtsseren für atypische Pneumonie wurde mit einem kommerziellen **MicroImmunoFluoreszenz-Test (MIF IgG)** analysiert und als Referenz für die Testentwicklung des **recomWell Chlamydia pneumoniae** herangezogen (Bewertung MIF $\geq 1:32$ = positiv und $< 1:32$ = negativ, nach Empfehlung des Konsiliarlabors für Chlamydien); positive Proben n=42, negative Proben n=39.

Positive und Grenzwertige (%)	recomWell Chlamydia pneumoniae (IgG)	Bestätigung von recomWell IgG positiven Befunden mit recomLine (IgG)	Kommerziell erhältlicher Test A	Kommerziell erhältlicher Test B
n=42 nach MIF-Test (IgG) $\geq 1:32$				
Positive Übereinstimmung	83,3%	73,8%	97,6%	100%

Negative (%)	recomWell Chlamydia pneumoniae (IgG)	Bestätigung von recomWell IgG positiven Befunden mit recomLine (IgG)	Vergleichstest A	Vergleichstest B
n=39 nach MIF-Test (IgG) $< 1:32$				
Negative Übereinstimmung	74,4%	92,3%	43,6%	46,2%

IgA:

Analysiert wurde ein Serenkollektiv von Patienten, die mit unterschiedlichen Diagnosen in Krankenhäuser eingeliefert wurden und bei denen eine atypische Pneumonie als Zufallsbefund festgestellt wurde (IgA positive n=16 mit MIF-Test (IgA) $\geq ++$; IgG positiv und gleichzeitig IgA negativ n=13 mit MIF-Test (IgA) $< ++$). Bei einem Teil dieser Patienten wurde eine bakterielle Pneumonie durch die radiologische Untersuchung bestätigt.

Es wurden zwei Kontrollkollektive in die Testevaluierung einbezogen.
Kollektiv 1: negative Kontrollgruppe (n=26, MIF $< ++$, Klinikum Jena);
Kollektiv 2: potenziell kreuzreagierende Kontrollgruppe (n=3, Chlamydia trachomatis IgG-positiv im MIF-Test, Chlamydia pneumoniae MIF-Test (IgG) $< 1:32$ und gleichzeitig MIF-Test (IgA) negativ).

recomWell Chlamydia pneumoniae IgA	Chlamydia pneumoniae – seronegativ nach MIF-Test (IgA) $< ++$ n=42 (13 +26 +3)	Chlamydia pneumoniae – seropositiv nach MIF-Test (IgA) $\geq ++$ n=16
Positive Übereinstimmung	-	87,5%
Negative Übereinstimmung	83,3%	-

Für IgM konnte keine Sensitivität ermittelt werden, da klinisch definierte IgM-positive Seren nicht zur Verfügung standen.

11.3 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Eignung des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potenziellen Interferenz-Faktoren in der Proben-Matrix oder Kreuzreaktionen mit potenziell interferierenden Antikörpern.

a) Interferenzen: Kontrollstudien über potenziell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistung des Tests nicht durch Antikoagulanzen (Natriumzitrat, EDTA, Heparin, CPD) beeinflusst wird. Interferenzen durch Lipämie oder Bilirubinämie der Probe können in einzelnen Fällen auftreten.

b) Kreuzreaktionen: Potenzielle Interferenzen von Antikörpern gegen EBV können selten auftreten. Potenzielle Interferenzen durch andere Konditionen, die auf eine atypische Aktivität des Immunsystems zurückzuführen sind (antinukleäre Autoantikörper, Schwangerschaft) können weitestgehend ausgeschlossen werden. Ausnahme: Selten kann eine Interferenz mit Rheumafaktor zu falsch positiven Ergebnissen im **recomWell Chlamydia pneumoniae IgG** führen. Gelegentlich können auch Chlamydia trachomatis IgG positive Seren falsch positive Ergebnisse im **recomWell Chlamydia pneumoniae IgG** zeigen.

Für die Bestimmung der analytischen Spezifität gegenüber potenziell interferierenden Antikörpern wurden folgende Seren herangezogen:

Blutspender (n=200)

- Seren von Patienten mit Pneumonie, vermutlich verursacht durch Mycoplasma pneumoniae, IgM-positiv (n=10)
- Chlamydia trachomatis IgG-positive Seren (n=20)
- Chlamydia trachomatis IgG- und IgA-positive Seren (n=10)
- Rheumafaktor-positive Seren (n=50)
- EBV-IgM-positive Seren (akute EBV-Infektion) (n=29)
- Ikterische Seren (n=9)
- Lipämische Seren (n=10)

Positivität (positive und grenzwertige) in %	recomWell Chlamydia pneumoniae			kommerziell erhältlicher Vergleichstest A			kommerziell erhältlicher Vergleichstest B		
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
Blutspender (n=200)	39,5	4,5	0	74	38	1	63	54,5	7
Mycoplasma pneumoniae, IgM-positiv (n=10)**	30	0	0	40	30	10	40	30	40
Chlamydia trachomatis IgG- (n=20) bzw. IgG,IgA-positiv (n=10)***	73,3	3,3	0	83,3	33,3	0	86,7	60	6,7
Rheumafaktor-Seren (n=50)	56	22	4	n.g.*	n.g.	n.g.	76	70	12
EBV-Seren IgM-positiv (n=29)****	41,4	3,4	24,1	48,3	34,5	27,6	51,7	60	96,6
Ikterische Seren (n=9)	88,9	11,1	0	100	55,6	0	100	77,8	100
Lipämische Seren (n=10)	70	20	0	90	90	0	90	100	20

* nicht geprüft

** mit einem kommerziell erhältlichen Mycoplasma pneumoniae ELISA geprüft

*** mit dem **recomLine Chlamydia** geprüft

**** mit dem **recomLine EBV** geprüft

11.4 Präzision

	recomWell Chlamydia pneumoniae IgG	recomWell Chlamydia pneumoniae IgA	recomWell Chlamydia pneumoniae IgM
Intra-Assay-Varianz*	VK $< 6,1\%$	VK $< 9,9\%$	VK $< 5,3\%$
Inter-Assay-Varianz**	VK $< 5,2\%$	VK $< 10,4\%$	VK $< 8,2\%$

* Drei positive oder grenzwertige Patientenproben wurden auf je 10, 11 oder 12 Kavitäten in diagonaler Anordnung auf einer Mikrotiterplatte getestet. Der Variationskoeffizient (VK) wurde für die U/ml der Proben errechnet.

** Drei positive oder grenzwertige Patientenproben unterschiedlicher Extinktionen wurden an drei verschiedenen Tagen als Vierfachbestimmung untersucht. Der Variationskoeffizient (VK) wurde für die U/ml der Proben errechnet.

12 Literatur

1. K.S. Rahman, E.U. Chowdhury, A. Poudel, A. Ruettger, K. Sachse, B. Kaltenboeck; *Defining species-specific immunodominant B cell epitopes for molecular serology of Chlamydia species*; Clin Vaccine Immunol., 2015 May, 22 (5): 539-52
2. R. Dumke, C. Schnee, M.W. Pletz, J. Rupp, E. Jakobs, K. Sachse, G. Rohde, CAPNETZ Study Group; *Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia spp. Infection in Community-Acquired Pneumonia, Germany, 2011-2012*; Emerging Infectious Diseases Vol. 21, No. 3, March 2015
3. L. Conklin, J. Adjemian, J. Loo, S. Mandal, C. Davis, S. Parks, T. Parsons, B. McDonough, J. Partida, K. Thurmann, M. H. Diaz, A. Benitez, T. Pondo, C. G. Whitney, J.M. Winchell, N. Kendig, C. Van Beneden; *Investigation of a Chlamydia pneumoniae Outbreak in a Federal Correctional Facility in Texas*; Clin Infect Dis. 2013 September; 57(5): 639-647

4. M. C. Phoon, G. W. J. Yee, W-P. Koh, V. T. K. Chow; *Comparative Seroepidemiologic Analysis of Chlamydomphila Pneumoniae Infection using Microimmunofluorescence, Enzyme Immunoassay and Neutralization Test: Implications for Serodiagnosis*; Indian J. Microbiol (Apr-June 2011) 51 (2); 223-229
5. V. Forsbach-Birk, U. Simnacher, K.-I. Pfrepper, E. Soutschek, A. O. Kiselev, M. F. Lampe, T. Meyer, E. Straube, A. Essig; *Identification and Evaluation of a combination of chlamydial antigens to support the diagnosis of severe and invasive Chlamydia trachomatis infections*; Journal Compilation 2009 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2009
6. N. Wellinghausen, E. Straube, H. Freidank, H. von Braun, R. Marre, A. Essig; *Low prevalence of Chlamydia pneumoniae in adults with community-acquired pneumonia*; Int J Med Microbiol. 2006 Nov; 296 (7); 485-91. Epub 2006 Aug 4.
7. S. Mukhopadhyay, A. P. Clark, E. D. Sullivan, R. D. Miller, J. T. Summersgill; *Detailed Protocol for Purification of Chlamydia pneumoniae Elementary Bodies*; Journal of Clinical Microbiology, July 2004, p. 3288-3290
8. L. A. Campbell, C.-C. Kuo, J. T. Grayston; *Structural and Antigenic Analysis of Chlamydia pneumoniae*; Infection and Immunity, Jan. 1990, p. 93-97

Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur Chlamydia-Diagnostik zu.

14 Hersteller- und Versionsdaten

recomWell Chlamydia pneumoniae IgG	Artikel-Nr. 6104
recomWell Chlamydia pneumoniae IgM	Artikel-Nr. 6105
recomWell Chlamydia pneumoniae IgA	Artikel-Nr. 6106
Gebrauchsanweisung gültig ab	GARECP005D 2023-06
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germany Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de
 0483	

13 Erläuterung der Symbole

	Inhalt ist ausreichend für <n> Ansätze Anzahl der Ansätze
WASHBUF 10 X	Waschpuffer (zehnfach konzentriert)
DILUBUF	Verdünnungspuffer
SUBS TMB	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin
SOLN STOP	Stopplösung
TAPE	Abdeckfolie
MTP	Mikrotiterplatte
CONTROL + IgG	Positive Kontrolle IgG
CONTROL ± IgG	Cutoff Kontrolle IgG
CONTROL - IgG	Negative Kontrolle IgG
CONJ IgG	IgG-Peroxidase-Konjugat
CONTROL + IgM	Positive Kontrolle IgM
CONTROL ± IgM	Cutoff Kontrolle IgM
CONTROL - IgM	Negative Kontrolle IgM
CONJ IgM	IgM-Peroxidase-Konjugat
CONTROL + IgA	Positive Kontrolle IgA
CONTROL ± IgA	Cutoff Kontrolle IgA
CONTROL - IgA	Negative Kontrolle IgA
CONJ IgA	IgA-Peroxidase-Konjugat
TVALUE	Zielwert und/oder Zielwertbereich in U/ml
EVALFORM	Auswertebogen
INSTRU	Gebrauchsanweisung
	Gebrauchsanweisung beachten
CONT	Inhalt, enthält
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Chargen-/Versionsnummer
	Nicht einfrieren
REF	Bestell-Nummer
	Verwendbar bis Verfallsdatum
	Lagerung bei x°C bis y°C
	Hersteller

