

MASTAZYME™ CHLAMYDIA

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Chlamydia sp. Antigen
Enzyme Immunoassay for the Detection of Chlamydia Antigen
Test ELISA pour la détection de l'antigène Chlamydia




Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

This product is intended for *in vitro* diagnostic use only.

Usage *in vitro* uniquement.








Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique

	Deutsch:	Seiten: 03–14
	English:	Pages: 15–27
	Francaise:	Pages: 28–39

MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA Kit	REF 695010	96 Tests / tests
MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transportmedium / Milieu de Transport	REF 695020	95 Fläschchen / vials / unités
MASTAZYME™ CHLAMYDIA Tupfer / Swabs / Ecouvillons	REF 695030	100 Stück / pieces / pièces

Lagerung / Storage / Conservation: 2–8 °C

Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:**Explanations of abbreviations and icons used on labels:****Explications des abréviations et des icônes utilisées sur les étiquettes:**

STRIPS	Mikrotiterstreifen	Microtiter strips	Films pour microplaque
CONTR +	Positive Kontrolle	Positive control	Contrôle positif
CONTR -	Negative Kontrolle	Negative control	Contrôle négatif
AB	monoklonaler Antikörper	Monoclonal antibody	Anticorps monoclonal
CONJ	HRP-Konjugat	HRP conjugate	Conjugué
SUBS	TMB-Substrat	TMB substrate	TMB substrat
STOP	Stopp-Lösung	Stopping solution	Solution d'arrêt
WASH	Waschpuffer	Washing buffer	Solution de lavage
LOT	Charge	Batch	Lot
	Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use	Lire la notice d'utilisation
	Wichtige Hinweise beachten	Important notes	Remarque importante
	Verfallsdatum	Expiry Date	Date de péremption
	Lagerung bei	Storage	Conservation
	Reagenzien nicht zur Wiederverbenutzung geeignet	Reagents not reusable	Ne pas réutiliser les réactifs

	Inhalt	Seite
1.	Einleitung	4
2.	Testprinzip und Verwendungszweck	4
3.	Packungsinhalt	5
4.	Zusätzlich benötigte Materialien	5
5.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	6
6.	Lagerung	7
7.	Testvorbereitung	7
8.	Testdurchführung	7
9.	Auswertung	8
10.	Interpretation	8
11.	Grenzen des Tests	9
12.	Testdaten	9
13.	Kreuzreaktionen	10
14.	Urogenitale Probennahme	11
15.	Konjunktivalabstriche	12
16.	Literatur	13
17.	Pipettierschema	14

1. Einleitung

Die Gattung Chlamydia umfasst 3 bekannte Species:

<i>Chlamydia trachomatis</i>	ein humanpathogener Erreger
<i>Chlamydia psittaci</i>	dieser Erreger ist pathogen bei Vögeln, Tieren und vereinzelt auch beim Menschen
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ein Infektionserreger, der beim Menschen zu respiratorischen Erkrankungen und atypischen Pneumonien führen kann ¹ .

Alle Chlamydien sind obligat intrazelluläre Organismen, die systematisch den Bakterien zugeordnet werden².

Innerhalb der Gattung Chlamydia ist *C. trachomatis* der klinisch wichtigste Erreger, da er in Industrieländern für die häufigste durch Geschlechtsverkehr übertragene Erkrankung verantwortlich ist. Es sind 15 Serovare dieses Erregers bekannt.

Die Serotypen A, B, Ba und C sind die Erreger, die zur Trachombildung führen, der häufigsten jedoch vermeidbaren Ursache für Erblindung. Die Serotypen L₁, L₂ & L₃ werden mit dem Lymphgranuloma venereum in Verbindung gebracht, die Serotypen D–K sind assoziiert mit Erkrankungen des Genitaltraktes, die von Urethritis, Zervitizitis, Vulvovaginitis und Proktitis bis zur Unfruchtbarkeit reichen. Viele dieser Erkrankungen werden nicht sofort erkannt und können dadurch schwerere Verläufe von Unterleibserkrankungen, Salpingitis und extrauterine Schwangerschaften bei Frauen⁴, bei Männern Nebenhodenentzündungen zur Folge haben.

Neben Erkrankungen des Genitaltraktes sind die Serotypen D–K häufig mit Konjunktivitis, Keratitis und gelegentlich mit dem vernarbenden oder endemischen Trachom assoziiert. Diesen Erkrankungen liegen jedoch häufig nicht erkannte Genitalinfektionen zu Grunde. Augenkomplikationen bei Neugeborenen und Atemwegserkrankungen wurden bei Kindern nachgewiesen, deren Mütter infiziert waren.

Der Infektionszyklus von *C. trachomatis* ist komplex. Die Infektion beginnt mit der Anlagerung von Elementarkörperchen (Elementary Bodies – EB) an Säulenepithelzellen, die über Endozytose in die Zellen gelangen. Die EB wachsen und differenzieren zu den Retikularkörperchen (Reticular Bodies – RB). Diese teilen sich und nach 24–48 h bilden sie in den größer werdenden Einschlüssen die EB. Ein Einschluss kann bis zu 10⁴ Chlamydien enthalten⁸.

In der Regel werden *C. trachomatis* Infektionen mittels nachstehender Methoden nachgewiesen:

- Zellkulturen tierischer Zellen werden mit Probenmaterial beimpft und etwaige Chlamydien-Einschlüsse durch Färbemethoden angefärbt und visuell ausgewertet. Erste Ergebnisse können nach etwa 48 Stunden erwartet werden.
- Nachweis von Chlamydia-spezifischen Nukleinsäuren durch Hybridisierung oder nach Amplifikation. Ergebnisse dieser Methoden sind in aller Regel verlässlich, aber kostenintensiv.
- Der direkte Erregernachweis mittels ELISA ist eine schnelle objektive Methode, die zuverlässig Ergebnisse von guter Sensitivität und Spezifität liefert.

Der MASTAZYME™ CHLAMYDIA ist ein schneller Test, der qualitative Ergebnisse liefert.

2. Testprinzip und Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ CHLAMYDIA Antigennachweis basiert auf dem Prinzip des Einschritt-Enzymimmunoassays. Mit diesem Testsystem kann Chlamydia trachomatis Antigen aus Urogenital- und Augenabstrichen nachgewiesen werden, die im MASTAZYME™ Transportmedium versendet werden.

Das Probenmaterial wird im Transportmedium 10 min gekocht. Nach Abkühlen wird das Probenmaterial zusammen mit dem Konjugat und dem monoklonalen Antikörper in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Chlamydia-spezifische Lipopolysaccharide (LPS) werden während des Inkubationsschritts (60 min 37 °C) durch monoklonale Antikörper (Maus) erkannt, die die Bindungsstelle für den Konjugatantikörper bilden. Unspezifisch und nicht gebundene Reaktions-

komponenten werden in einem Waschschrift entfernt. Die TMB-Substratreaktion ergibt in Gegenwart von spezifischen Immunkomplexen eine Blaufärbung in den Wells, die nach dem Abstoppen in eine gelbe Farbe umschlägt.

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (falls vorhanden mit einem Referenzfilter: 600–690 nm) ausgewertet werden. Die Extinktion ist proportional der Antigenkonzentration.

Das LPS-Antigen von *C. trachomatis* ist Genus-spezifisch und ermöglicht somit auch die Detektion von *C. psittaci* und *C. pneumoniae*. Die Bestimmung von (gelösten) Chlamydia trachomatis-Antigenen ist zuverlässig, erfordert nur geringen Zeitaufwand und ist nicht unbedingt auf natives Probenmaterial angewiesen.

Der Test darf nur zur in vitro Diagnostik verwendet werden.

3. Packungsinhalt:

1. 12 x Vorbehandelte Mikrotiterstreifen mit je 8 abbrechbaren Wells.
2. 4 x Abdeckfolie für Mikrotiterstreifen.
3. 1 x 5,5 mL Monoklonaler Anti-Chlamydia-Antikörper (Maus), gerichtet gegen Chlamydia-spezifisches LPS; gelöst in PBS-Puffer, enthält BSA und 0,1% Proclin, die Lösung ist blau gefärbt; gebrauchsfertig.
4. 1 x 3 mL Konjugat, Meerrettichperoxidase-markierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Schaf), gelöst in PBS-Puffer, enthält fetales Kälberserum und 0,1% Proclin, rot gefärbte Lösung; gebrauchsfertig.
5. 4 x 1 mL Positive Kontrolle; gebrauchsfertig.
6. 4 x 1 mL Negative Kontrolle; gebrauchsfertig.
7. 2 x 25 mL Waschlösung, 30-fach konzentriert, bestehend aus:
 - 0,9% (w/v) NaCl, Endkonzentration
 - 0,05% (w/v) Tween 20, Endkonzentration
 - 0,003% (v/v) Proclin, Endkonzentration.
8. 1 x 22 mL TMB-Lösung (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin); gebrauchsfertig.
Die Lösung ist Methanol- und DMSO-frei.
9. 1 x 12 mL Stopplösung, enthält 2 N H₂SO₄, gebrauchsfertig.

4. Zusätzlich benötigte Materialien

1. Vortex
2. Heizblock oder Wasserbad zum Erhitzen der Proben auf 100 °C
3. Präzisionspipetten mit 25 µL, 50 µL und 200 µL Volumen oder Mehrkanalpipetten zum Pipettieren der entsprechenden Volumina
4. Einmal-Pipettenspitzen
5. Aqua dest. oder HPLC-Grade Wasser
6. Saubere Messzylinder mit einem Volumen von 500 mL, 1000 mL oder 2000 mL.
7. Saubere Gefäße (Erlenmeyer-Kolben, Bechergläser) mit einem Volumen von 1000 mL oder 2000 mL
8. Laborzentrifuge (2500 x g)
9. 37 °C Inkubator für die Mikrotiterplatten

10. Automatik-Washer oder geeignete manuelle Waschsyste
11. ELISA-Mikrotiterplatten-Reader mit einem 450 nm Filter (optional Referenzfilter: 620 nm)
12. MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transportmedium (Best.-Nr.: 695020)
13. MASTAZYME™ CHLAMYDIA Abstrichtupferset (Best.-Nr.: 695030)

Für die urogenitale und endozervikale Probennahme, sowie bei Augenabstrichen dürfen nur Tupfer aus Dacron verwendet werden. Die Tupfer dürfen keinen Holzschafft haben. Tupfer mit Transportmedium aus Calcium Alginat, Agar oder Kohle dürfen nicht verwendet werden (Dacron ist ein eingetragener Handelsname der DuPont Inc.).

5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Alle Testreagenzien nur zur in vitro-Diagnostik verwenden.
2. Vor Testbeginn die Gebrauchsinformationen sorgfältig lesen. Die Testdurchführung darf nicht abgewandelt werden. Der Kit darf nur vom Laborfachpersonal abgearbeitet werden.
3. Der MASTAZYME™ CHLAMYDIA Test dient zur Untersuchung von Urogenitalabstrichen und Augenabstrichen. Vorschriften zur Behandlung von potentiell infektiösem Material müssen eingehalten werden.
4. Immer saubere Pipettenspitzen zum Pipettieren von Konjugat, Proben und Antikörpern benutzen. Mikropipetten gemäß der Herstelleranleitung benutzen.
5. Kreuzkontaminationen der Reagenzien vermeiden.
6. Alle Proben sorgfältig handhaben und Kreuzkontamination der Wells vermeiden.
7. Rand- und Seitenwandbenetzung der Wells vermeiden.
8. Ein Austrocknen der Wells während des Tests vermeiden.
9. Angebrochene Konjugat- und Antikörperfläschchen auf eventuelle mikrobielle Kontamination prüfen.
10. Kit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht weiter verwenden.
11. Keine Kitreagenzien aus verschiedenen Chargen kombinieren.
12. Keine Reagenzien verwenden, die Farbveränderungen oder Trübungen zeigen.
13. Die Mikrotiterplatte nur einmal verwenden.
14. Nicht mit dem Mund pipettieren.
15. Die positive Kontrolle wurde bei Anzucht auf entsprechenden Zellkulturen als nicht infektiös befunden; trotzdem ist sie als potentiell infektiös zu behandeln, da mit den bekannten Testmethoden eine Infektiosität nicht ausgeschlossen werden kann.
16. Nur Laborwasser von höchster Qualität verwenden (z. B. Aqua dest., Aqua bidest., Aqua inieciabilia, HPLC Grade).
17. Vor der Hitzeinaktivierung müssen alle Proben oder Kontrollen auf Raumtemperatur äquilibriert werden.
18. Das chromogene TMB-Substrat ist brennbar und kann bei Kontakt mit der Haut Reizungen verursachen. Von offener Flamme fernhalten.
19. Die Stopplösung, 2 N H₂SO₄, ist korrosiv. Kontakt mit Haut, Schleimhäuten und Augen vermeiden.
20. Es ist sicherzustellen, dass beim Umgang mit Patientenproben alle für den Umgang mit infektiösem Material relevanten Sicherheitsvorschriften eingehalten werden. Alle Kontrollen und Proben sind nach Gebrauch entsprechend den Sicherheitsvorschriften für potentiell infektiöses Material zu entsorgen.

6. Lagerung

Der MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch sind die Reagenzien bei 2–8 °C für 3 Monate stabil. Klinische Proben können bei 2–8 °C bis zu 8 Tagen, bei -70 °C bis zu 6 Monaten aufbewahrt werden.

Hitzebehandelte Patientenproben können bei 2–8 °C für 24 Stunden, bei -20 °C bis zu 4 Wochen gelagert werden.

7. Testvorbereitung

1. Alle Proben und Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur gebracht werden.
2. 50 mL des Waschpufferkonzentrats mit destilliertem Wasser auf 1500 mL (= 1:30 Verdünnung) auffüllen und gut durchmischen. Es wird empfohlen, nur jeweils das benötigte Waschlösungsvolumen anzusetzen.

8. Testdurchführung

Vorbemerkung: Beim Pipettieren der Reagenzien und Proben ist die nachstehende Reihenfolge unbedingt einzuhalten:

1. **Konjugat** (rot gefärbte Lösung)
2. **Probe(n)** (Gefäß mit Transportmedium und Tupfer) **oder Kontrollen**
3. **Monoklonaler Antikörper** (blau gefärbte Lösung)

Um optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, dürfen keine Tropfen von Reagenzien oder Proben am Rand der Wells hängen bleiben. Die Reaktionen müssen vor den jeweiligen Inkubationsschritten sorgfältig gemischt werden.

1. Vor dem Test die Röhrchen mit dem Probenmaterial sowie die positiven und negativen Kontroll-Lösungen durch Schütteln (15 sec) gut durchmischen.
2. Die Proben- und Kontrollröhrchen 10 min bei 100 °C im Heizblock o.ä. erhitzen. Die Deckel der Röhrchen leicht öffnen (Druckausgleich!).
3. Nach Beendigung des Hitzeschrittes die Proben entnehmen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
4. Zwischenzeitlich kann die Mikrotiterplatte mit der benötigten Anzahl von Streifen/Wells zusammengesetzt werden. 2 Wells für die Kontrollen (1 negativ, 1 positiv) berücksichtigen!
5. 25 µL des rot gefärbten Konjugats pipettieren.
Optional: Die Sensitivität des Tests erhöht sich, wenn der Ansatz nach der Konjugatdispensierung für 3–5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Die abgekühlten Proben und Kontrollen durch Schütteln (15 sec) nochmals gut durchmischen.
7. 200 µL Proben- bzw. Kontroll-Lösung in die entsprechenden Wells pipettieren. Die Position der einzelnen Proben protokollieren, um Verwechslungen auszuschließen.
8. 50 µL blau gefärbte Antikörperlösung zu den Ansätzen in die Wells pipettieren. Bei diesem Reaktionsschritt kommt es zu einem Farbumschlag von rot nach grau.
9. Die Wells mit der mitgelieferten Abdeckfolie versiegeln und gut mischen.
10. Die Reaktionsansätze bei 37 °C 1 Stunde (+/- 3 min) inkubieren.

11. Nach der Inkubation die Reaktionsansätze 5 x mit 350 µL Waschpuffer waschen. Reste der Waschlösung zum Schluss durch vorsichtiges Klopfen aus den Wells entfernen. (Bei Benutzung eines automatischen Waschgeräts muss das Gerät vorher mit Waschpuffer äquilibriert werden). Längeres Einwirken des Waschpuffers auf den Ansatz kann zu nicht aussagekräftigen Ergebnissen führen!
12. 200 µL gebrauchsfertige Substratlösung in jedes Well pipettieren.
13. Die Reaktionsansätze abdecken und bei Raumtemperatur 20 min im Dunkeln inkubieren. Chlamydia-positive Reaktionen zeigen eine blaue Farbe.
14. 50 µL Stopplösung in jedes Well pipettieren, dabei die Reihenfolge und das Zeitintervall wie bei der Substratzugabe einhalten. Die Reaktionsansätze gut mischen!
Nach Zugabe der Stopplösung werden Chlamydia-positive Reaktionen gelb.
15. Die Reaktionsansätze innerhalb von 30 min mit einem ELISA-Platten-Reader bei 450 nm auswerten. Das Gerät gegen Luft eichen.
16. Die Ergebnisse der Auswertung protokollieren.

9. Auswertung

Vorbemerkung: Nach Eichung des Geräts sollte der Mittelwert der negativen Kontrolle bei $\leq 0,2$ Extinktionseinheiten, die positive Kontrolle bei $\geq 0,7$ Extinktionseinheiten liegen. Bei abweichenden Ergebnissen ist der Test nicht verwertbar und sollte wiederholt werden. Chargenspezifische Messdaten finden sich im QC-Zertifikat, das jedem Kit beiliegt.

1. Bei Mehrfachbestimmung den Mittelwert der negativen Kontrolle berechnen.
2. Berechnung des Cut-off (Grenzwert):
Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,1 Extinktionseinheiten
3. Berechnung der oberen Grenze der "Grauzone": Cut-off + 0,05 Extinktionseinheiten

10. Interpretation der Ergebnisse

1. Ein **positives** Ergebnis liegt vor, wenn die Extinktion über dem oberen Wert der "Grauzone" liegt.
2. Ein **negatives** Ergebnis liegt vor, wenn die Extinktion dem Wert des Cut-off entspricht oder diesen unterschreitet.
3. Werte, die zwischen dem "Cut-off + 0,05" Extinktionseinheiten und dem Grenzwert liegen, fallen in die Grauzone. Der Test sollte bei Proben, die in diesem Absorptionsbereich liegen, wiederholt werden.

Interpretation der Ergebnisse bei Nachtestung

Bei jeder Probe, deren Extinktionswert innerhalb der "Grauzone" liegt, sollte die Bestimmung wiederholt werden. Erneutes Kochen der Proben ist allerdings nicht erforderlich. 2 Wells für die negative, 1 Well für die positive Kontrolle sollen im Wiederholungstest ebenfalls mitgeführt werden. Die Kontrollen sind -soweit möglich- den gleichen Fläschchen wie im Originaltest zu entnehmen.

Der Cut-off Wert ist aufgrund der wiederholten Negativ- und Positiv-Kontrolle zu errechnen. Extinktionen der Proben, die höher als der Cut-off liegen, sind als positiv zu bewerten. Proben, die den gleichen oder einen niedrigeren Extinktionswert als der Cut-off aufweisen, sind als negativ zu betrachten.

11. Grenzen des Tests

1. Der MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA wurde mit rektal abgenommenen Proben nicht validiert.
2. Das Testergebnis darf nicht allein zur Bewertung des Ergebnisses herangezogen werden. Es sollte immer unter Berücksichtigung anderer Labor- und klinischer Daten interpretiert werden.
3. Ein negatives Ergebnis schließt nicht zwangsläufig eine Chlamydieninfektion aus. So kann der Test falsch-negativ ausfallen, wenn vor der Abnahme der Probe andere Abstriche aus dem gleichen Bereich genommen wurden. Die Anzahl der Organismen kann zu gering sein, um ein positives Ergebnis zu erhalten.
4. Der MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA kann nicht zur Therapiekontrolle einer Chlamydieninfektion verwendet werden.
5. Bei forensischen Fragestellungen sollte der MASTAZYME™ CHLAMYDIA nicht als einziger Labortest verwendet werden.

12. Testdaten

a) Urogenitalabstriche

Der ELISA wurde an 2040 Proben getestet, die an vier unabhängigen Kliniken in Großbritannien und den USA abgenommen wurden. Die Proben stammen von Patienten, die aufgrund von Beschwerden die Klinik aufgesucht haben oder aus einem Umfeld kommen, das eine hohe Prävalenz an Chlamydia-Infektionen aufweist (9,86 %–16,63 %). Als Referenzmethode wurde die McCoy-Zellkultur herangezogen. Dazu diskrepante Ergebnisse wurden mit der direkten Immunfluoreszenz weiter abgeklärt. Zusammengefasst stimmten die ELISA mit den Zellkulturergebnissen in 96,8 % der Fälle überein.

In der Gruppe der positiv getesteten Proben lag der Anteil von männlichen zu weiblichen Proben etwa bei 1:2, geschlechtsspezifische Faktoren hatten auf das Ergebnis keinen Einfluss. Die zusammengefassten Ergebnisse ergeben folgendes Bild:

	Zellkultur	
	+	-
MASTAZYME™ +	227	26
CHLAMYDIA -	39	1748
Sensitivität	= 85,3 %	
Spezifität	= 98,5 %	
Positiv prädiktiver Wert	= 89,7 %	
Negativ prädiktiver Wert	= 97,8 %	

b) Augenabstriche

In einer Klinik wurden 173 Proben von Augenabstrichen getestet. Die Patienten stammten aus einer symptomatischen Gruppe mit einer Chlamydien-Infektionsprävalenz von 13,8 %. Anhand dieser Probandengruppe wurden nachstehende Daten ermittelt:

	Zellkultur	
	+	-
MASTAZYME™ +	23	1
CHLAMYDIA -	1	148
Sensitivität	= 95,8 %	
Spezifität	= 99,3 %	

c) Urinproben (nur Männer)

1147 Urinproben wurden mit diesem ELISA getestet. Davon wurden 222 Proben (19,4 %) nach Probennahme mit einem Tupfer in der Zellkultur nachgewiesenermaßen positiv an drei unabhängigen Kliniken getestet. Die Testprotokolle entsprachen einer allgemein üblichen Methode. Als Urinproben wurde Morgenurin von symptomatischen Patienten verwendet und die Ergebnisse mit denen der Zellkultur verglichen unter Verwendung des MASTAZYME™ CHLAMYDIA Blocking Tests. Abweichende Ergebnisse wurden mit der direkten Immunfluoreszenz abgeklärt. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

	Zellkultur	
	+	-
MASTAZYME™ +	184	21
CHLAMYDIA -	38	904
Sensitivität	=	82,1 %
Spezifität	=	97,7 %
Positiv prädiktiver Wert	=	89,8 %
Negativ prädiktiver Wert	=	96,0 %

Des Weiteren wurden 1022 Urinproben einer asymptomatischen männlichen Gruppe untersucht. Innerhalb dieser Gruppe waren 70 Probanden (6,85 %) als bestätigt positiv bekannt (Bestätigungstest: McCoy-Zellkultur).

	Zellkultur	
	+	-
MASTAZYME™ +	61	18
CHLAMYDIA -	9	934
Sensitivität	=	87,1 %
Spezifität	=	98,1 %
Positiv prädiktiver Wert	=	77,2 %
Negativ prädiktiver Wert	=	99,1 %

Es wird darauf hingewiesen, dass die Sensitivitätsangabe ein noch besseres Ergebnis bringt, wenn nicht bestätigte negative ELISA-Ergebnisse als richtig-negativ gewertet werden, da der direkte Immunfluoreszenznachweis ebenso ein negatives Ergebnis gezeigt hat.

13. Kreuzreaktionen

Die Verwendung anderer als der im Kit vorhandenen Reagenzien oder eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.

Umfangreiche Testungen auf Kreuzreaktivität haben gezeigt, dass folgende Mikroorganismen bei einer Anzahl von etwa 10^8 Organismen/Test durch den MASTAZYME™ CHLAMYDIA Test nicht nachgewiesen werden konnten:

Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter Iwoffii*, *Bacteroides bluus*, *Bacteroides capillus*, *Bacteroides fragilis* (3 Isolate), *Bacteroides melanogenicus*, *Bacteroides necrophorus*, *Bacteroides nucleatum*, *Bacteroides sphaericus*, *Candida albicans* (7 Isolate), *Corynebacterium diptheriae* (2 Isolate), *Clostridium perfringens*, *Clostridium spp.*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli* (4 Isolate), *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus sp.*, *Moraxella sp.*, *Neisseria gonorrhoea* (3 Isolate), *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (2 Isolate), *Staphylococcus aureus* (5 Isolate), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococci sp.* (Gruppe G).

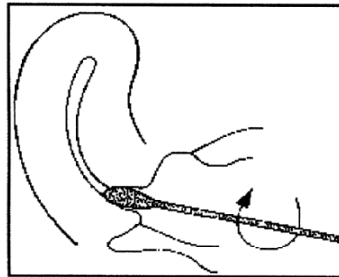
14. Urogenitale Probenentnahme

Proben aus der weiblichen Zervix und Urethra sowie aus der männlichen Urethra sollten so viele Epithelzellen wie möglich enthalten.

Sollen Proben zusätzlich auf Gonorrhoe untersucht werden, so ist dies vor Abnahme der Chlamydienbestimmung mit einem speziellen Tupfer durchzuführen.

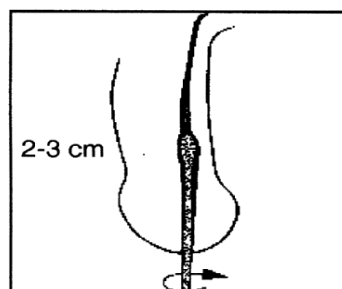
Probenentnahme bei der Frau

1. Den Zervixbereich mit einem großen Tupfer von überflüssigem Vaginalsekret reinigen.
2. Den Tupfer zur Probenentnahme in den endozervikalen Kanal einführen und 5–10 sec kräftig drehen.
3. Den Probenentnahmetupfer in den Portiobereich weiterführen. Durch kräftiges Drehen Probenmaterial entnehmen. Beim Herausführen des Tupfers den Kontakt mit den Vaginalwänden vermeiden.
4. Bei Abstrichen aus der Urethra (ca. 30 % der Infektionen) den Tupfer 2–3 cm unter Drehen in die Urethra einführen. Den Tupfer etwa 10 sec kräftig drehen, damit ein Kontakt mit dem Zylinderepithel gewährleistet ist.
5. Die Spitze des Tupfers in das Transportmedium eintauchen, kräftig schütteln und den Plastikstiel an der Kerbe abbrechen.
6. Das Gefäß mit Tupfer und Transportmedium verschließen und in das entsprechende Labor einsenden.



Probenentnahme beim Mann

1. Proben sollten nicht abgenommen werden, wenn der Patient innerhalb der letzten Stunden uriniert hat.
2. Den Tupfer ca. 2–3 cm unter rotierendem Vorschub in die Urethra einführen, ca. 10 sec kräftig drehen, um einen Kontakt mit den Urethra-Epithelien zu gewährleisten.
3. Die Spitze des Tupfers in das Transportmedium eintauchen, kräftig schütteln und den Plastikstiel an der Kerbe abbrechen.
4. Das Gefäß mit Tupfer und Transportmedium verschließen und in das entsprechende Labor einsenden.



5. Urinproben (Mann)

25 mL des ersten Morgenurins sammeln. Keine Sammelbehälter mit Borat-Puffer verwenden, da eine Änderung des pH-Wertes die Testdurchführung beeinträchtigen kann.

Vor der Testdurchführung sollte der Urin wie folgt behandelt werden:

Mindestens 15 mL Urin kurz mischen (Vortex, 20 sec) und anschließend zentrifugieren (2500 x g, 20 min), Überstand verwerfen und Präzipitat in 1 mL MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transportmedium lösen.

Unbehandelte Urinproben können bis zu 24 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden. Re-suspendiertes Präzipitat kann bis zu 24 Stunden bei 2–8 °C, und bis zu 3 Tagen bei -70 °C gelagert werden.

15. Konjunktivalabstriche

1. Vor der Probennahme das Unterlid des entzündeten Auges von Exsudat reinigen.
2. Anschließend den Tupfer kräftig über die gereinigte Konjunktiva drehen.
3. Den Tupfer in das Transportmedium eintauchen, kräftig umrühren und an der Kerbe abbrechen.
4. Das Gefäß mit Tupfer und Transportmedium verschließen und in das entsprechende Labor einsenden.

16. Literatur

1. Grayston JT, Kuo CL *et al.* *Chlamydia pneumoniae* sp. nov for Chlamydia sp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 1989; **39**: 88-90
2. Schachter J. Chlamydia (Psittacosis-Lymphogranuloma Venerum-Trachoma Group) ch 85 in *Manual of Clinical Microbiology* 4th edition Ed Tenet A.S.M. 1985
3. Taylor Robinson D, Thomas BJ. The role of *Chlamydia trachomatis* in genital tract and associated diseases *J Clin Pathol* 1980; **33**: 205-233
4. Brunham RC, Maclean IW *et al.* *Chlamydia trachomatis*; it's role in tubal infertility. *J Infect Dis* 1985; **152**: 1275-1282
5. Weström L. Incidence, prevalence and trends in acute pelvic inflammatory disease and its consequence in industrial countries. *Am Obstet & Gynecol* 1980; **138**: 880-892
6. Goh B. *Chlamydia trachomatis* genital infection. *The Practitioner* 1988; **232**: 813-818
7. Alexander ER, Harrison HR. Role of *Chlamydia trachomatis* in perinatal infection. *Rev Infect Dis* 1983; **5**: 713-719
8. Wentworth BB, Judson FN. *Laboratory Methods for Diagnosis of STD*. Am Public Health Ass. 1984.

17. Pipettierschema

1. Waschpuffer Konzentrat 1:30 mit destilliertem Wasser verdünnen.
2. Proben und Kontrollen kurz mischen – Vortex, 15 sec.
3. Proben und Kontrollen für 10 min bei 100 ± 5 °C inkubieren.
4. Proben und Kontrollen auf RT abkühlen.
5. 25 µL Konjugat in die entsprechenden Wells pipettieren.
6. 200 µL Probe bzw. Kontrolle in die entsprechenden Wells pipettieren.
7. 50 µL Antikörperlösung zupipettieren.
8. Wells mit Folie verschließen, mischen und bei 37 °C für 60 ± 3 min inkubieren.
9. Wells 5 x mit mindestens 350 µL verdünntem Waschpuffer waschen.
10. 200 µL TMB zupipettieren.
11. Wells verschließen, vorsichtig mischen und für 20 ± 2 min bei RT im Dunkeln inkubieren.
12. Reaktion durch Zugabe von 50 µL Stopplösung / Wells beenden, mischen.
13. Bei 450 nm im Photometer messen.
14. Cut-off und Graubereich berechnen und Proben auswerten.

Content	Page
1. Intended Use	16
2. Introduction	16
3. Principle of the Test	16
4. Contents	17
5. Materials required but not provided	17
6. Warnings and Precautions	18
7. Storage and Stability	19
8. Specimen Collection and Handling	19
9. Assay Procedure	19
10. Results and Interpretation	21
11. Limitation of Test	22
12. Performance Characteristics	22
13. Annex: Collection of Specimens	24
14. References	26
15. Method Summary	27

1. Intended Use

MASTAZYME™ CHLAMYDIA is a sensitive enzyme immunoassay for the detection of Chlamydia antigen in female endocervical, male urethral and ophthalmic swab specimens. The test may also be used on male urine samples.

2. Introduction

The genus Chlamydia comprises 3 identified species: *Chlamydia trachomatis* which is pathogenic principally to man, *Chlamydia psittaci* which is pathogenic to birds, animals and occasionally man, and *Chlamydia pneumoniae* which causes respiratory infections and atypical pneumonia in man.¹ All Chlamydia are obligate intracellular organisms classified as bacteria.²

C. trachomatis is clinically one of the most important pathogens and is the leading cause of sexually transmitted diseases in industrialised countries.³ There are 15 known serotypes².

Serotypes A, B, Ba and C are the agents of trachoma, the commonest preventable cause of blindness; serotypes L₁, L₂ & L₃ are associated with Lymphogranuloma venereum while the remaining serotypes, D-K, are associated with genital tract infections ranging from non-gonococcal urethritis, cervicitis, vulvovaginitis, proctitis and infertility, many of which remain undetected and untreated, to more severe manifestations such as pelvic inflammatory disease, salpingitis and ectopic pregnancy in females^{4,5} and epididymitis in males. Serotypes D-K may also cause inclusion conjunctivitis, punctate keratitis and occasionally scarring or endemic trachoma. Most of these arise in patients with unrecognised genital symptoms.⁶ Neonatal ophthalmic complications and respiratory diseases may occur in children born to infected mothers.⁷

The life cycle of *C. trachomatis* is complex. Infection is initiated by the attachment of the elementary body (EB) to columnar epithelial cells where it gains entry by endocytosis. EBs grow and differentiate to form reticulate bodies (RBs).

These then divide by binary fission and after 24–48 hours the RBs differentiate within the expanding inclusion to form EBs. A mature inclusion may contain approx. 10⁴ chlamydial bodies.⁸

Routine diagnosis of *C. trachomatis* infections involves one of the following methods:

- a) Culturing patient material in animal cells and observing the intracellular chlamydial inclusion bodies by staining and visual examination. However, this takes at least 48 hours.
- b) Detection of Chlamydia by nucleic acid hybridisation or amplification. Results are reliable but cost intensive.
- c) Direct examination of patient material by enzyme immunoassay (EIA) or immunofluorescence. The EIA method is rapid and independent of microscopic assessment and hence is the method of choice for many laboratories.

MASTAZYME™ CHLAMYDIA is a rapid EIA test for the qualitative determination of Chlamydia antigen permitting clinicians to detect and consequently treat chlamydial infections effectively.

3. Principle of the Test

MASTAZYME™ CHLAMYDIA Antigen ELISA is based on the principle of a one step enzyme immunoassay. Urogenital (female endocervical or male urethral) or ophthalmic swabs are obtained from the patient and placed into the MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium. Urine samples are vortexed for 20 seconds then centrifuged for 20 minutes at 2500 x g and the resulting pellet is resuspended in 1 vial of MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium.

Specimens and controls must be thoroughly mixed, boiled for 10 minutes then cooled before use. Into a pre-treated microwell an aliquot of each of the following are dispensed in the order given – (1) anti-mouse IgG HRP antibody conjugated to horseradish peroxidase enzyme, (2) preboiled specimen or control sample, and (3) mouse IgG monoclonal antibody specific for Chlamydia lipopolysaccharide (LPS).

After a 60 min incubation at 37 °C, the wells are washed to remove any unbound material and complexed enzyme is detected by the addition of the chromogenic substrate 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB). During incubation, the enzyme reaction produces a blue colour and this reaction is terminated after a specific time with acid which converts any colour produced to an intense yellow.

The wells are then read spectrophotometrically. The intensity of the colour reaction is therefore proportional to the amount of Chlamydia antigen in the patient's sample.

The mouse monoclonal antibody is genus specific and does not differentiate between *C. trachomatis*, *C. psittaci* and *C. pneumoniae*.

4. Contents

1. 12 x Microtiter strips with 8 precoated break-apart wells, supplied in a strip holder, and sealed in an aluminium pouch with a sachet of silica gel.
2. 4 x Self-adhesive plate sealers.
3. 1 x 5.5 mL Mouse monoclonal antibody specific for Chlamydia lipopolysaccharide, diluted in blue coloured solution containing PBS buffer, BSA and 0.1 % of Proclin as a preservative. Supplied ready to use.
4. 2 x 3 mL Sheep anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase, diluted in a red coloured solution containing PBS buffer, BSA and 0.1 % of Proclin as a preservative. Supplied ready to use.
5. 4 x 1 mL Positive control, a semi-purified preparation of *C. trachomatis* serovar L2 grown in McCoy cells diluted in a modified MASTZYME CHLAMYDIA Transport Medium. Supplied ready to use.
6. 4 x 1 mL Negative control, MASTZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium. Supplied ready to use.
7. 2 x 25 mL Washing buffer, supplied 30 x concentrated, consisting of:
 - 0.9 % (w/v) NaCl, final concentration
 - 0.05 % (w/v) Tween 20, final concentration
 - 0.003 % (w/v) Proclin, final concentration
8. 1 x 22 mL TMB substrate (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine), DMSO free reagent. Supplied ready to use.
9. 1 x 12 mL Stop solution, contains 2 N H₂SO₄. Supplied ready to use.

5. Materials required but not provided

1. Vortex mixer.
2. A laboratory centrifuge capable of attaining 2500 x g.
3. Heating block with 17–18 mm diameter holes or an alternative method capable of heating specimens to 100 °C ± 5 °C e.g. water bath.
4. Precision micropipettes both single and multichannel capable of dispensing 25 µL, 50 µL and 200 µL.
5. Disposable pipette tips.
6. A supply of distilled or deionised water (ultrapure or HPLC grade water).
7. A range of clean standard volumetric laboratory glass or plastic containers of 500 mL, 1000 mL or 2000 mL volume.
8. Centrifuge (2500 x g).

9. 37 °C incubator.
10. Manual washing system or an automatic positive pressure plate washer to fill and aspirate off contents of wells. (N.B. plate washer relying on gravity fed washing solutions are not suitable.)
11. Absorbent paper towel.
12. ELISA microplate reader with a 450 nm filter setting (optional: reference filter 620 nm).
13. MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium (Ref. No. 695020, Ref. No. in UK: EIA 502).
14. MASTAZYME™ CHLAMYDIA Specimen Collection Swabs (Ref. No. 605030); female endocervical and male urethral Dacron® tipped swabs only should be used. Wooden shafted swabs, alginate swabs and agar or charcoal containing swabs should not be used. Dacron® is a registered trademark of DuPont Inc.).

6. Warnings and Precautions

1. The reagents supplied in this kit are for in vitro diagnostic use only.
2. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the instruction procedure.
3. Do not use kit beyond the expiry date.
4. Do not interchange reagents between different kit lots as reagents have been calibrated for each kit.
5. Examine all kit reagents before performing an assay. Reagents should not be used if they appear cloudy or are suspect for any reason.
6. All reagents should be stored at 2–8 °C and brought to room temperature before use.
7. Do not re-use microwells.
8. Do not mouth pipette.
9. The positive control is supernatant material from infected tissue culture cells and has been shown to be non-infectious when inoculated onto susceptible cells in culture. Treat as potentially infectious material at all times.
10. Use high quality distilled or deionised water (ultrapure or HPLC grade water) throughout.
11. Do not transfer specimens directly from -70 °C or 2–8 °C to heating block. Always allow specimen to equilibrate to room temperature before heating.
12. Do not allow microwell to dry out during the assay procedure.
13. Do not heat-expose the chromogenic TMB substrate. TMB is flammable. In use avoid contact with skin, eyes and mucous membranes and keep away from heat and naked flames.
14. Protect solution from exposure to direct light. The substrate incubation step should be conducted in the dark.
15. The stop solution contains H₂SO₄ which is corrosive. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes.
16. Use disposable plasticware where possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
17. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Use separate pipettes or pipette tips for each sample or reagent.
18. Do not cross-contaminate specimen between wells. If while dispensing, specimen or reagent is dropped on the surface of the well strips then blot dry immediately.

19. The local operating procedures for the containment of potentially infectious material have to be practised. Specimens may contain infectious organisms e.g. HIV 1 or 2, hepatitis viruses. Boiling the specimens should inactivate the virus if present. However, exercise extreme care at all times when handling human specimen.
20. Dispose all clinical and control material safely and in accordance with local operation regulations.

7. Storage and Stability

1. The MASTAZYME™ CHLAMYDIA kit and all unused components can be used until the expiry date displayed on the label, if stored at 2–8 °C.
2. Store all part-used reagents at 2–8 °C where possible.
3. Clinical swab specimens can be stored at 2–8 °C for up to 8 days prior to use in the kit or for up to 6 months at -70 °C.
4. Male urine specimens can be stored for up to 24 hrs. at 2–8 °C.
Boiled specimens (swabs and male urines) can be stored at 2–8 °C for up to 24 hrs. If further storage is required the samples may be kept at -20 °C for up to 4 weeks.
6. Working strength washing buffer may be stored in tightly capped containers at 15–30 °C for up to one month.

8. Specimen Collection and Handling

The kit is designed for use with human urogenital (female endocervical and male urethral), ophthalmic and male urine specimens.

Do not use MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium which shows any sign of contamination i.e. turbid or discoloured.

Urogenital and ophthalmic swab specimens should contain as many epithelial cells as possible, as Chlamydia are intracellular organisms that infect epithelial cell surfaces.

If a gonorrhoea specimen is required collect first before taking the chlamydial specimen using a separate swab.

9. Assay Procedure

Important note: The following pipetting sequence is essential for good kit performance:

1. **Conjugate** (red coloured solution)
2. **Specimen** (vial with transport medium including swab) **or controls**
3. **Monoclonal antibody** (blue coloured solution)

Make sure all reagents are at the bottom of the microtiter well. Carefully mix the reaction mix before incubation.

1. Prepare a 1 in 30 dilution of the concentrated washing buffer using ultrapure water as required or dilute the entire volume (2 vials–50 mL each) with 1450 mL of ultrapure water.
2. Allow all reagents, microwells and test specimens to equilibrate to room temperature before proceeding further with the assay.
3. Vortex mix all test specimens and controls (1 positive and 1 negative) for 15 seconds.

4. Heat all specimens and controls to $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes in an electrical heating block or boiling water bath. Ensure that the vial caps are loosened and that water does not enter the vials during boiling.
5. Remove vials after 10 minutes and cool to room temperature before proceeding further.
6. Select the required number of microwell strips for the assay allowing 3 wells for controls (2 for the negative and 1 for the positive control). Remove the strips that are not required from the frame and return them to the plastic storage bag with the sachet of silica gel and re-seal immediately.

Important: Dispense all reagents and specimens in the order described below, i. e. conjugate first, then specimen and finally antibody.

7. Dispense 25 μL of red coloured conjugate into each well. Make a visual check to ensure all wells contain conjugate.
8. Vortex mix the test specimens and controls for 15 seconds then dispense 200 μL into their respective allocated wells.

Record the position in the place of each specimen and control by the letter and number reference moulded into the strip holder.

9. Dispense 50 μL of blue coloured antibody into each well. Make a visual check to ensure that all wells contain antibody. All wells should appear grey in colour at this stage.
10. Cover the microwell strips with plate sealing film provided to prevent evaporation of liquid from the wells.
11. Tap the side of the frame gently to ensure adequate mixing of reagents in the microwells taking care not to splash reagents on the upper portion of the wells. All wells should have a homogeneous colour throughout and have no evidence of layering of reagents.
12. Incubate at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 ± 3 minutes.
13. After incubation remove the plastic seal and wash the plate with pre-diluted washing buffer either (a) manually with a wash bottle or (b) with a positive pressure automatic plate washer (do not use a gravity fed washer). Do not allow wells to soak in washing buffer.

- a) Hold the frame securely and shake contents of the wells into a suitable container.

Wash wells with at least 350 μL of washing buffer from a wash bottle and shake contents out again.

Repeat the wash step to a total of 5 times.

Finally invert the plate and bang firmly onto absorbent paper towels to remove any residual fluid from the wells. Check that no fluid remains in the wells and blot dry the surfaces of the wells using a fresh absorbent paper towel.

- b) Using an automatic plate washer empty and wash wells with at least 350 μL a total of 5 times in accordance with the manufacturer's instructions. Do not use wash programs which include a soaking step.

It is important to check that the washing combs are clean and not blocked, and are filling the wells completely each time.

After washing invert the plate and bang firmly onto absorbent paper towel to remove any residual fluid from the wells and blot dry the surfaces of the wells using a fresh absorbent paper towel.

14. Dispense 200 µL of ready to use TMB solution into all wells. A multichannel pipette is recommended for this step.
15. Cover the microwell strips with a fresh piece of plate sealing film, tap the sides of the frame gently to ensure adequate mixing and that no reagents adhere to the upper portion of the wells.
16. Incubate in the dark at room temperature for 20 ± 2 minutes.
17. After incubation terminate the reaction by adding 50 µL of stopping solution to all wells in the same sequence and at the same time interval as the TMB solution addition in step 14.
18. Gently tap the frame to ensure uniform mixing of reagents and that no unreacted reagents adhere to the upper portion of the wells. Visually check that the colour is homogeneous and no layering of reagent is evident in individual wells.
19. Read results after adding the stopping solution within 30 minutes using a suitable microplate reader with a 450 nm filter setting (reference filter 620–690 nm). Blank the reader against air.

10. Results and Interpretation

Criteria for interpretation:

- The mean extinction value of the negative control should be less than 0.2 OD values.
- The extinction value of the positive control should be higher than 0.7 OD values.
- If negative and positive controls do not fit into these criteria the test should not be interpreted and has to be repeated.
- For batch specific OD values see “Certificate of Kit Performance” supplied in the kit.

1. Calculation of Results

- a) Calculate the average absorbance value obtained for the negative controls.
- b) Calculate the cut-off value as follows:
Cut-off = mean absorbance of negative controls + 0.1 absorbance units
- c) Calculate the upper limit for the borderline area as follows:
Upper limit = cut-off value + 0.05 absorbance units

2. Assay Validation

- a) The average absorbance value for the negative controls should be less than 0.20 absorbance units.
- b) The positive control should have a reading of greater than 0.7 absorbance units.
If these criteria are not fulfilled the assay is considered invalid and should be repeated.

3. Interpretation of Results

- a) A test specimen with an absorbance value greater than the upper limit of the borderline area is considered positive.
- b) A test specimen with an absorbance value equal to or less than the cut-off level is considered negative.
- c) A test specimen with an absorbance between the cut-off level and the upper limit is considered borderline and should be re-tested. Do not re-boil specimens and controls on re-testing.

- d) If a test specimen gives repeatedly borderline results a further specimen should be obtained from the patient and tested.
- e) Boiled swab and male urine specimens requiring confirmation and controls can be stored at 2–8 °C for up to 24 hours or at -20°C for up to 4 weeks.

11. Limitations of Test

1. MASTAZYME™ CHLAMYDIA has not yet been evaluated with rectal specimens.
2. All test results should be interpreted in conjunction with other clinical data and medical judgement.
3. A negative result does not necessarily indicate the absence of chlamydial infection. Numbers of organisms below the detection limit of the kit or improper sampling may give false negative results. Sample culture is recommended if a chlamydial infection is still suspected.
4. MASTAZYME™ CHLAMYDIA has not been assessed for its use in the determination of the patients response to therapy.
5. Test results in low prevalence populations should be interpreted with care and in conjunction with all clinical evidence.
6. Diagnosis of chlamydial infection in forensic cases e.g. rape or child abuse, should be done using tissue culture.

12. Performance Characteristics

1. Sensitivity and Specificity

a) Male urethral and female endocervical specimens

MASTAZYME™ CHLAMYDIA has been tested on 2,040 samples at four independent clinical trial centres in the UK and USA. Specimens were randomly selected from high prevalence populations attending STD clinics with disease incidences or prevalence ranging from 9.86 %–16.63 %. Results were compared with swab culture using McCoy cells, with discrepant results further examined by direct immunofluorescence testing on the centrifuged deposit of the specimen collected for MASTAZYME™ CHLAMYDIA evaluation. Overall accuracy or efficiency of MASTAZYME™ CHLAMYDIA against culture was shown to be 96.8 %.

The total number of positives were split approximately 1 male: 2 female, and there was little difference in performance between the two groups. Combined performance figures were as follows:

	culture	
	+	-
MASTAZYME™ +	227	26
CHLAMYDIA -	39	1748
Sensitivity	= 85.3 %	
Specificity	= 98.5 %	
positive predictive value	= 89.7 %	
negative predictive value	= 97.8 %	

b) Ophthalmic Specimens

173 ophthalmic swab specimens were tested using MASTAZYME™ CHLAMYDIA at an independent clinical trial centre. The specimens were collected from symptomatic adults with a prevalence of 13.8 % chlamydial infection. The following performance figures were obtained.

	culture	
	+	-
MASTAZYME™ +	23	1
CHLAMYDIA -	1	148
Sensitivity	= 95.8 %	
Specificity	= 99.3 %	

c) Male Urine Specimens

MASTAZYME™ CHLAMYDIA has been tested on 1,147 samples, 222 (19.4 %) of which were registered positive on swab culture at three independent clinical trial centres in the UK and USA. Each centre used a common protocol. Results from the MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA on first pass urines from symptomatic males were compared with those from urethral swab retested using the MASTAZYME™ CHLAMYDIA Blocking Test and discrepant results were investigated further using direct immunofluorescence. The following performance figures were obtained.

	culture	
	+	-
MASTAZYME™ +	184	21
CHLAMYDIA -	38	904
Sensitivity	= 82.1 %	
Specificity	= 97.7 %	
positive predictive value	= 89.8 %	
negative predictive value	= 96.0 %	

Further studies on 1,022 urine samples from asymptomatic males where 70 (6.85 %) registered positive on swab culture produced the following performance figures.

	culture	
	+	-
MASTAZYME™ +	61	18
CHLAMYDIA -	9	934
Sensitivity	= 87.1 %	
Specificity	= 98.1 %	
positive predictive value	= 77.2 %	
negative predictive value	= 99.1 %	

It should be emphasised that sensitivity figures could be improved by re-classifying EIA not confirmed negatives as true negatives where direct immunofluorescence results were also negative.

2. Cross-reactivity

The following organisms were found to be non-reactive in the MASTAZYME™ CHLAMYDIA test when present at approximately 10⁹ CFU/test:

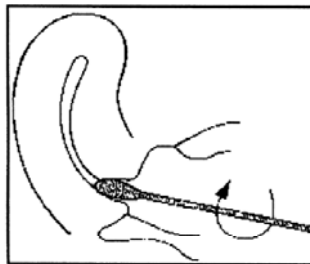
Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter Iwoffii*, *Bacteroides bluus*, *Bacteroides capillus*, *Bacteroides fragilis* (3 isolates), *Bacteroides melanogenicus*, *Bacteroides necrophorus*, *Bacteroides nucleatum*, *Bacteroides sphaericus*, *Candida albicans* (7 isolates), *Corynebacterium diphtheriae* (2 isolates), *Clostridium perfringens*, *Clostridium spp.*, *Cytomegalovirus*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli* (4 isolates), *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex Viruses types I & II*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus sp*, *Moraxella sp*, *Neisseria gonorrhoea* (3 isolates), *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (2 isolates), *Staphylococcus aureus* (6 isolates, one Protein A - producing Strain), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Treptococcus sp.* (Group A, B and G), *Ureaplasma urealyticum*.

13. Annex: Collection of Specimens

1. Female endocervical specimens (Fig.1)

Clean the exocervical area with sterile gauze or swab before sampling, to remove excess mucus. Insert the appropriated swab into the endocervical canal and rotate vigorously for 5–10 seconds at the columnar epithelial junction. Move the swab to the portio region and rotate vigorously, then withdraw the swab without touching the vaginal walls and immerse the tip of the swab into MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium.

Agitate vigorously, break off the swab shaft and leave swab tip in the vial tightly sealed. Record patient details on vial label and send to the laboratory. Specimens may be stored at 2–8 °C for up to 8 days prior to use or at -70 °C for up to 6 months.

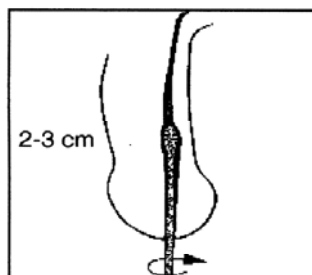


2. Male urethral specimens (Fig.2)

Specimens should not be collected if the male has urinated within the previous hour.

Insert the appropriate male swab 2–3 cm into the urethra rotating the swab for 10 seconds and ensuring that all surfaces of the urethra are contacted. Withdraw the swab and immerse into MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium. Agitate vigorously, break off the swab shaft and leave the swab tip in the vial tightly sealed.

Record patient details on vial label and send to the laboratory. Specimens may be stored at 2–8 °C for up to 8 days prior to use or at -70 °C for up to 6 months.



3. Ophthalmic specimens

Carefully remove excess exudate from the surface of the eye before sampling. Using an appropriate swab, firmly swab the inner surface of the lower, then the upper eyelid. If specimens are to be taken from both eyes, use a separate swab for each eye. Place directly into a vial of MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium. Agitate vigorously, break off the shaft of the swab and leave the swab tip in the vial tightly sealed.

Record patient details on vial label and send to the laboratory. Specimens may be stored at 2–8 °C for up to 8 days prior to use or at -70 °C for up to 6 months.

4. Male urine specimens

Collect 25 mL of a first void clean catch urine specimen. Do not use borate buffered collection containers as this affects the acidity of the sample which in turn affects the assay performance.

Prior to use in the assay, the urine should be processed as follows: take a minimum of 15 mL of the urine sample, vortex for 20 seconds to mix, then centrifuge at 2500 x g for 20 minutes. After centrifugation resuspend the urine deposit in one (1 mL) vial of MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium:

Unprocessed urines may be stored at 2–8 °C for no longer than 24 hrs. Resuspended urine deposits in MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transport Medium can be stored at 2–8 °C for up to 24 hrs. or at -70 °C for up to 3 days prior to testing.

14. References

1. Grayston JT, Kuo CL *et al.* *Chlamydia pneumoniae* sp. nov for Chlamydia sp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 88-90
2. Schachter J. Chlamydia (Psittacosis-Lymphogranuloma Venerum-Trachoma Group) ch 85 in *Manual of Clinical Microbiology* 4th edition Ed Tenet A.S.M. 1985
3. Taylor Robinson D, Thomas BJ. The role of *Chlamydia trachomatis* in genital tract and associated diseases *J Clin Pathol* 1980; 33: 205-233
4. Brunham RC, Maclean IW *et al.* *Chlamydia trachomatis*; it's role in tubal infertility. *J Infect Dis* 1985; 152: 1275-1282
5. Weström L. Incidence, prevalence and trends in acute pelvic inflammatory disease and its consequence in industrial countries. *Am Obstet & Gynecol* 1980; 138: 880-892
6. Goh B. *Chlamydia trachomatis* genital infection. *The Practitioner* 1988; 232: 813-818
7. Alexander ER, Harrison HR. Role of *Chlamydia trachomatis* in perinatal infection. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 713-719
8. Wentworth BB, Judson FN. *Laboratory Methods for Diagnosis of STD*. Am Public Health Ass. 1984.

15. Method Summary

1. Prepare working strength washing buffer – 1 in 30 dilution.
2. Select the required number of microwell strips.
3. Vortex mix all test specimens and controls – 15 seconds.
4. Heat test specimens and controls to 100 ± 5 °C for 10 minutes.
5. Allow specimens and controls to cool to room temperature.
6. Dispense 25 µL of conjugate per well.
7. Vortex mix all test specimens and controls.
8. Dispense 200 µL of test specimens or controls to the designated wells.
9. Dispense 50 µL of antibody per well.
10. Seal the wells, mix contents and incubate at 37 °C for 60 ± 3 minutes.
11. Wash all wells 5 times with at least 350 µL working strength washing buffer.
12. Dispense 200 µL of TMB solution to all wells.
13. Seal the wells, mix contents and incubate in the dark 20 ± 2 minutes at room temperature.
14. Stop the reaction by adding 50 µL per well of stopping solution. Mix contents.
15. Read wells at 450 nm.
16. Calculate the cut-off value, borderline area and assess status of test specimen.

Sommaire	Page
1. Domaine d'utilisation	29
2. Introduction	29
3. Principe du test	29
4. Composition du coffret	30
5. Matériel nécessaire non fourni	30
6. Précautions d'emploi	31
7. Conservation des réactives	32
8. Prélèvement et transport des échantillons	32
9. Procédure ELISA	32
10. Résultats et Interprétation	34
11. Limites du test	35
12. Performances et Caractéristiques du test	35
13. Réactions croisées	37
14. Annexe: prélèvements des échantillons	37
15. Références	38
16. Résumé de la méthode	39

1. Domaine d'utilisation

MASTAZYME™ CHLAMYDIA est un test ELISA sensible pour la détection de l'antigène Chlamydia lors de prélèvements endocervicaux chez la femme, urétraux chez l'homme et ophtalmiques sur écouvillons. Ce test peut également être utilisé sur des échantillons urinaires chez l'homme.

2. Introduction

Le genre Chlamydia comprend trois espèces identifiées: *Chlamydia trachomatis* qui est principalement pathogène chez l'homme, *Chlamydia psittaci* qui est pathogène chez les oiseaux, les animaux et occasionnellement l'homme, et *Chlamydia pneumoniae*, qui est responsable d'infections respiratoires et de pneumonies atypiques chez l'homme [1]. Les Chlamydia sont des micro-organismes intracellulaires obligatoires et font partie des bactéries [2].

Sur le plan clinique, *C. trachomatis* fait partie des bactéries pathogènes les plus souvent responsables des maladies sexuellement transmissibles dans les pays industrialisés [3]. Il y a 15 sérotypes connus [2]. Les sérotypes A, B et C sont responsables du trachome, cause majeure de la cécité. Les sérotypes L1, L2, et L3 sont associés au *Lymphogranuloma venereum*. Les sérotypes D à K sont associés aux infections du tractus génital comprenant l'urétrite non gonococcique, la cervicite, la vulvo-vaginite, la prostate, des cas de stérilité et beaucoup d'autres cas qui demeurent non dépistés ou non traités ainsi que des manifestations plus sévères comme la maladie inflammatoire pelvienne, la salpingite ou la grossesse ectopique chez la femme [4,5] et l'épididymite chez l'homme. Les sérotypes D, K sont aussi responsables de conjonctivites avec inclusion de kératites ponctuées et occasionnellement de trachomes endémiques ou épars. Ces problèmes surviennent chez les patients ayant des symptômes génitaux tardifs [6]. Les complications ophtalmiques néonatales et les maladies respiratoires peuvent se produire chez les enfants nés de mères infectées [7].

Le cycle de *C. trachomatis* est complexe. L'infection débute par l'adsorption des corps élémentaires (CE) aux cellules épithéliales puis la pénétration des CE par endocytose. Les CE croissent et se multiplient par scission binaire. Après une incubation de 24 à 48 heures des corps réticulés différenciés sont présents alors que les corps élémentaires continuent à se multiplier. Le cycle de réplication se termine au bout de 48 à 72 heures par la rupture des inclusions libérant ainsi les corps élémentaires. Une inclusion à maturité peut contenir environ 10^4 corps élémentaires de Chlamydia [8].

Le diagnostic des infections à *C. trachomatis* se fait en routine par l'une des méthodes suivantes:

- a) **Culture sur cellules animales** du prélèvement du patient et observations des inclusions intracellulaires par coloration et examen au microscope. Cette technique nécessite environ 48 heures.
- b) **Examen direct de l'échantillon par une technique ELISA ou par immunofluorescence**. La méthode ELISA est rapide et indépendante du microscope utilisé et de ce fait est une méthode de choix pour de nombreux laboratoires.

3. Principe du test

MASTAZYME™ CHLAMYDIA Antigen ELISA est un test ELISA immunoenzymatique.

Un prélèvement par écouvillonnage urogénital (au niveau de l'urètre chez l'homme et au niveau endocervical chez la femme) ou ophtalmique est effectué puis introduit dans le milieu de transport MASTAZYME™ CHLAMYDIA. Les échantillons d'urines sont vortexés pendant 20 secondes puis centrifugés à 2500 x g pendant 20 minutes. Le culot de centrifugation est repris dans un flacon de milieu de transport MASTAZYME™ CHLAMYDIA.

Les échantillons et les contrôles sont agiter vigoureusement puis chauffés à 100 °C pendant 10 minutes puis refroidis Déposer dans un puits de la microplaque prétraitée dans l'ordre suivant: (1) l'anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase du raifort (2) les échantillons et contrôles thermisés (3) l'anticorps monoclonal de souris IgG spécifique des lipopolysaccharides (LPS) des Chlamydia.

Après incubation de 60 minutes à 37 °C, les puits sont lavés pour éliminer le matériel non lié puis le complexe enzymatique est détecté par addition de substrat chromogénique (3,3', 5,5' Tetraméthylbenzidine (TMB)). Durant l'incubation, la réaction enzymatique produit une coloration bleue.

La réaction est ensuite stoppée par ajout d'une solution acide provoquant une coloration jaune des réactifs contenus dans les puits.

La microplaque est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm. L'intensité de coloration est directement proportionnelle à la quantité d'antigène Chlamydia présente dans l'échantillon.

L'anticorps monoclonal de souris est spécifique de l'antigène de genre et ne permet pas de différencier *C. trachomatis*, *C. psittaci* et *C. pneumoniae*.

4. Composition du coffret

1. **Microplaque contenant 12 barrettes de 8 puits sensibilisés** dans un sachet plastique avec du gel de silice comme dessiccateur.
2. **Films pour microplaque:** 4 films adhésifs pour microplaque.
3. **Anticorps:** 1 flacon de 5,5 mL d'anticorps monoclonal de souris dirigé spécifiquement contre les lipopolysaccharides de Chlamydia dilué dans une solution tamponnée bleue contenant du PBS, de la sérum albumine bovine et 0,1 % de Proclin comme conservateur. Prêt à l'emploi.
4. **Conjugué:** 1 flacon de 3 mL d'anticorps anti-IgG de mouton conjugué à la peroxydase du raifort, dilué dans une solution colorée en rouge et contenant du tampon PBS, du sérum de veau foetal et 0,1 % de Proclin comme conservateur. Prêt à l'emploi.
5. **Contrôle positif:** 4 flacons de 1mL d'une préparation semi-purifiée de *C. trachomatis* sérovar L2, cultivée sur cellules de McCoy et diluée dans un milieu de transport. Stérile et prêt à l'emploi.
6. **Contrôle négatif:** 4 flacons contenant chacun 1 mL de milieu de transport, stérile et prêt à l'emploi.
7. **Solution de lavage:** 2 flacons contenant chacun 25 mL de solution tamponnée contenant 0,9 % (p/v) de NaCl, 0,05 % (p/v) de Tween 20, concentrée 30X et additionnée de 0,003 % (p/v) de Proclin comme conservateur.
8. **Substrat:** 1 flacon contenant 22 mL d'une solution de 3,3', 5,5', tétraméthylbenzidine (TMB) sans DMSO. Le tampon substrat est prêt à l'emploi.
9. **Solution d'arrêt:** 1 flacon de 12 mL de solution d'H₂SO₄ 2N, prête à l'emploi.

5. Matériel nécessaire mais non fourni

1. Vortex.
2. Bloc chauffant pour tubes de 16–18 mm de diamètre ou autre système permettant un chauffage à 100 °C ± 5 °C (bain-marie).
3. Pipettes multicanaux et pipettes de précision (25 µL, 50 µL, 200 µL).
4. Embouts de pipette.
5. Eau distillée ou eau désionnisée (ultrapure ou HPLC).

6. Pots en plastique à usage unique de 500 mL et 1000 mL ou 2000 mL.
7. Centrifugeuse (2500 tr/min).
8. Etuve à 37 °C.
9. Laveur automatique ou semi-automatique. Le lavage manuel par gravité n'est pas adapté.
10. Papier absorbant.
11. Lecteur de plaque ELISA avec filtre à 450 nm (optionnel filtre à 620 nm).
12. Milieu de transport. MASTAZYME™ Chlamydia (Code 695020).
13. Ecouillons en Dacron pour prélèvements endocervical chez la femme et urétral chez l'homme. Ne pas utiliser d'écouvillons avec hampe en bois, d'écouvillons avec alginate de calcium, ou d'écouvillons avec milieu de transport au charbon ou gélatine. Dacron est une marque déposée de DuPont Inc.

6. Précautions d'emploi

1. Les réactifs de ce coffret sont uniquement destinés à l'usage in vitro.
2. Lire soigneusement le mode d'emploi avant d'effectuer le test. Ne pas modifier la procédure.
3. Ne pas utiliser le coffret au-delà de la date de péremption indiquée sur le coffret.
4. Ne pas interchanger les réactifs de différents lots car les réactifs ont été calibrés pour chaque lot.
5. Examiner tout coffret avant utilisation; les réactifs ne doivent pas être troubles ou douteux.
6. Tous les réactifs doivent être stockés à 2–8 °C et ramenés à température ambiante avant utilisation.
7. Ne pas ré-utiliser les puits usagés.
8. Ne pas pipeter avec la bouche.
9. Le contrôle positif issu du surnageant de culture de cellules infectées s'est avéré non infectieux lors de la culture in vitro sur cellules sensibles, néanmoins le considérer à tout moment comme potentiellement infectieux.
10. Utiliser une eau distillée ou désionisée ultrapure.
11. Ne pas déposer les échantillons conservés à -70 °C ou à 8 °C directement à 100 °C mais attendre qu'ils soient à température ambiante.
12. Ne pas laisser sécher les puits entre les différentes étapes de la technique ELISA.
13. Le substrat TMB doit être protégé de la chaleur car il est inflammable. Eviter tout contact avec la peau, les yeux ou les muqueuses lors de la manipulation de ces réactifs ainsi que toute proximité avec une source de chaleur ou une flamme directe.
14. Protéger la solution de substrat de la lumière directe. L'incubation du substrat se fait dans l'obscurité.
15. La solution d'arrêt contient du H₂SO₄ qui est considéré comme corrosif. Eviter tout contact avec les yeux, la peau ou les muqueuses.
16. Utiliser le plus possible du matériel à usage unique. Le verrerie doit être lavée vigoureusement rincée sans détergents avant utilisation.
17. Ne pas intervertir les réactifs ou les bouchons des flacons. Changer de pipettes ou d'embouts entre chaque échantillon.

18. Ne pas contaminer les puits un à un. Veiller à éliminer à l'aide d'un papier absorbant toute goutte tombant sur la bordure d'un puits.
19. S'assurer que la zone de manipulation est adaptée à la manipulation de matériel potentiellement infectieux. Les échantillons peuvent contenir des micro-organismes potentiellement infectieux comme le HIV-1 ou HIV-2. Le chauffage à 100 °C de l'échantillon devrait inactiver le virus s'il est présent. Il est cependant recommandé d'être extrêmement vigilant lors de la manipulation d'échantillon d'origine humaine.
20. Manipuler et éliminer tout le matériel clinique et les contrôles selon les recommandations locales en vigueur.

7. Conservation des réactifs

1. Conservés à 2–8 °C, le coffret **MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA** et tous les réactifs non usagés sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
2. Stocker tous les réactifs partiellement utilisés à 2–8 °C.
3. Les prélèvements sur écouvillons peuvent être conservés 8 jours à 2–8 °C ou 6 mois à -20 °C avant utilisation.
4. Les échantillons urinaires peuvent être stockés à 2–8 °C pendant au maximum 24 heures. Les échantillons thermisés (écouvillons et urines chez l'homme) peuvent être conservés jusqu'à 24 heures à 2–8 °C, ou si nécessaire à -20°C pendant plus de 4 semaines.
5. La solution de lavage concentrée se conserve plus d'un mois à 15–30 °C après à condition de bien reboucher le flacon après chaque utilisation.

8. Prélèvement et transport d'échantillon

Le coffret est destiné à être utilisé pour des prélèvements urogénitaux (urétral ou endocervical) ou ophtalmiques chez l'homme.

Ne pas utiliser le milieu de transport s'il présente des signes de contamination (ex: trouble du milieu ou décoloration).

Les prélèvements sur écouvillon, urétraux ou ophtalmiques doivent contenir la quantité maximale de cellules épithéliales, car les Chlamydia sont des bactéries intracellulaires infectant les cellules épithéliales de surface.

Pour une gonorrhée, utiliser deux écouvillons différents: l'un pour la recherche de Chlamydia, l'autre pour l'isolement des gonocoques.

9. Procédure ELISA

REMARQUE IMPORTANTE: Distribuer impérativement tous les réactifs et les échantillons dans l'ordre suivant:

1. le conjugué (solution colorée en rouge)
2. l'échantillon (flacon avec le milieu de transport contenant l'écouvillon) ou les contrôles
3. l'anticorps monoclonal (solution colorée en bleu).

Bien vérifier que les réactifs sont au fond des puits et agiter la plaque avant incubation.

1. Effectuer une dilution au 1:30 de la solution de lavage concentrée dans la quantité d'eau ultrapure nécessaire ou diluer la quantité totale du flacon (50 mL) dans 1450 mL d'eau ultrapure.
2. Ramener le coffret à température ambiante avant utilisation.
3. Vortexer pendant 15 secondes les échantillons à tester ainsi que le contrôle positif et le contrôle négatif du coffret.
4. Chauffer les échantillons et les contrôles à $100\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ pendant 10 minutes à l'aide d'un bloc chauffant ou d'un bain marie. S'assurer de la bonne fermeture des bouchons afin que l'eau ne pénètre pas dans les tubes au cours du chauffage.
5. Sortir les tubes et les laisser refroidir à température ambiante avant l'étape suivante.
6. Sélectionner le nombre de puits nécessaires pour effectuer le test en réservant 3 puits pour les contrôles (2 puits pour le contrôle négatif, 1 puits pour le contrôle positif). Remettre les barrettes en excès dans le sachet plastique contenant le gel de silice comme dessiccateur et bien refermer le sachet immédiatement.

IMPORTANT: Distribuer tous les réactifs et les échantillons dans l'ordre suivant: d'abord le conjugué, ensuite l'échantillon puis en dernier l'anticorps.

7. Distribuer dans chaque puits, 25 μL de conjugué coloré en rouge. S'assurer visuellement que tous les puits sont bien remplis.
8. Vortexer les échantillons et les contrôles pendant 15 secondes puis en distribuer 200 μL dans les puits respectifs. Identifier la position des échantillons déposés dans les puits de la microplaque à l'aide des lettres et des chiffres inscrits sur le support de plaque.
9. Distribuer 50 μL d'anticorps coloré en bleu dans chaque puits. S'assurer visuellement que tous les puits sont bien remplis. Tous les puits devraient apparaître en gris à ce stade de la réaction.
10. Couvrir la microplaque avec un film transparent afin d'éviter l'évaporation pendant la phase d'incubation.
11. Taper tout doucement sur le côté de la microplaque pour permettre un mélange adéquat des réactifs contenus dans les puits en prenant soin de ne pas provoquer d'éclaboussures sur la partie supérieure des puits.
12. Incuber à 37 °C pendant 60 ± 3 minutes.
13. Après incubation, éliminer le film protecteur et laver la plaque avec la solution de lavage diluée soit (a) manuellement avec une pissette soit (b) avec un laveur de microplaques (ne pas utiliser de laveur alimenté par gravité). Ne pas laisser tremper les puits dans la solution de lavage.

a) manuellement :

Retourner la plaque pour vider les puits au-dessus d'un récipient approprié. Remplir immédiatement les puits de la microplaque avec au moins 350 μL de solution de lavage contenue dans une pissette et éliminer à nouveau le liquide des puits. Répéter **5 fois** cette étape. Retourner ensuite la plaque et la frapper fortement sur du papier absorbant pour éliminer tout le liquide résiduel des puits. Sécher la surface des puits avec un nouveau papier absorbant.

b) avec un laveur automatique de microplaque (ne pas utiliser de laveur alimenté par gravité):

Effectuer 5 cycles de lavage avec au moins 350 μL de solution de lavage sans temps de trempage à l'aide du laveur automatique de microplaque. Il est important que les canaux soient propres et non obstrués pour un remplissage régulier des puits à chaque cycle. Après le lavage, retourner la plaque et la frapper fortement sur du papier absorbant pour éliminer tout le liquide résiduel des puits. Sécher la surface des puits avec un nouveau papier absorbant.

14. Distribuer dans chaque puits 200 µL de solution de substrat (TMB). Une pipette multicanaux est recommandée pour cette étape.
15. Couvrir les barrettes de la microplaque avec un nouveau film transparent fourni. Taper tout doucement le côté de la microplaque pour permettre un mélange adéquat des réactifs contenus dans les puits en prenant soin de ne pas éclabousser la partie supérieure des puits.
16. Incuber à température ambiante pendant 20 minutes à l'obscurité.
17. Après incubation, arrêter la réaction par ajout de 50 µL de solution d'arrêt dans chaque puits. Une pipette multicanaux est recommandée pour cette étape.
18. Taper doucement le support de plaque pour obtenir un mélange homogène des réactifs et éviter qu'une partie du substrat adhérant à la partie supérieure du puits ne réagisse pas avec la phase. Vérifier que la coloration est homogène et qu'aucun dépôt de réactif n'apparaît dans chaque puits.
19. Deux à dix minutes après l'addition de la solution d'arrêt lire la Densité Optique de chaque puits à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque approprié. Le blanc est effectué sur l'air.

10. Résultats et Interprétation

Critères d'interprétation:

- La DO moyenne du contrôle négatif doit être inférieure à 0,2.
- La DO moyenne du contrôle positif doit être supérieure à 0,7.
- Si les contrôles ne sont pas validés, le test doit être refait.
- Pour les DO spécifiques d'un lot de production, se référer au Certificat d'analyse fourni avec le kit.

1. Calcul des résultats

- a) Calculer la valeur de **DO moyenne du contrôle négatif**.
- b) Calculer le seuil des négatifs de la manière suivante: **DO moyenne du contrôle négatif + 0,1 unité de DO**.
- c) Calculer le seuil des positifs correspondant à la limite supérieure de la zone grise de la manière suivante: **Valeur du Seuil des négatifs + 0,05 unités de DO**.

2. Validation du test

- a) La DO moyenne du contrôle négatif doit être inférieure à 0,20.
- b) La DO du contrôle positif doit être supérieure à 0,7.
Si ces deux critères ne sont pas réunis, le test n'est pas validé et doit être répété.

3. Interprétation des résultats

- a) **Résultat positif:** DO de l'échantillon > Seuil des positifs.
- b) **Résultat négatif:** DO de l'échantillon < ou = Seuil des négatifs.
- c) **Résultat douteux:** Seuil des négatifs < DO échantillon < Seuil des positifs. Dans ce cas, l'échantillon doit être re-testé.
- d) Si un échantillon donne des résultats douteux de façon répétitive il sera utile d'effectuer un autre prélèvement d'échantillon.
- e) Les échantillons thermisés à 100 °C et nécessitant une confirmation ou des contrôles peuvent être stockés à 2–8 °C pendant 24 heures ou à -20 °C pendant 4 semaines.

11. Limites du test

1. **MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA** n'a pas fait l'objet d'une évaluation pour les prélèvements rectaux.
2. Tous les résultats doivent être interprétés en relation avec les données cliniques et l'avis médical.
3. Un résultat négatif n'indique pas nécessairement l'absence d'une infection à Chlamydia. Le nombre de micro-organismes en dessous de la limite de détection du coffret ou un mauvais prélèvement peuvent engendrer des résultats faussement négatifs. Une culture de l'échantillon est recommandée si une infection à Chlamydia est encore suspectée.
4. **MASTAZYME™ CHLAMYDIA** n'a pas été évalué pour son intérêt dans la détermination de la réponse aux agents thérapeutiques.
5. Les résultats du test sur les populations à prévalence faible doivent être interprétés avec soin et en relation avec les données cliniques.
6. Le diagnostic des infections à Chlamydia dans les cas d'incestes (ex: viol ou abus d'enfants), doit être obtenu en utilisant la technique de la culture cellulaire.

12. Performances et caractéristiques du test

1. Sensibilité et spécificité

a) Echantillon endocervical et urétral

Le coffret **MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA** a été testé sur une population de 2040 prélèvements provenant de quatre centres d'essais cliniques répartis entre les USA et le Royaume-Uni. Les échantillons ont été choisis au hasard à partir d'une population à prévalence élevée et consultant les cliniques spécialisées en MST (incidence ou une prévalence de 9,86 % à 16,33 %).

Les résultats obtenus par le test **MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA** ont été comparés à la culture de prélèvement d'écouvillon sur cellules de McCoy. Les résultats discordants ont été analysés en immunofluorescence directe à partir d'un culot de centrifugation de l'échantillon à tester. La fiabilité et l'efficacité de **MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA** est de 96,8 % par rapport à la culture cellulaire.

Le nombre total de positifs correspond à un ratio de deux femmes pour un homme avec une légère différence entre les deux groupes. Les performances des essais sont résumées dans le tableau ci-joint:

	Culture cellulaire	
	+	-
MASTAZYME™ +	227	26
CHLAMYDIA -	39	1748
Sensibilité	= 85,3 %	
Spécificité	= 98,5 %	
Valeur prédictive positive	= 89,7 %	
Valeur prédictive négative	= 97,8 %	

b) Prélèvements ophtalmiques

Un centre d'essai clinique indépendant a testé MASTAZYME™ CHLAMYDIA sur 173 échantillons ophtalmiques. Les échantillons ont été prélevés sur des adultes symptomatiques ayant une prévalence pour l'infection à Chlamydia de 13,8 %.

Les performances de l'essai sont résumées dans le tableau ci-joint :

	Culture cellulaire	
	+	-
MASTAZYME™ +	23	1
CHLAMYDIA -	1	148
Sensibilité	= 95,8 %	
Spécificité	= 99,3 %	

c) Echantillons d'urine chez l'homme

Sur 1147 échantillons testés avec le coffret MASTAZYME™ CHLAMYDIA, 222 (19,4 %) se sont avérés positifs chez trois laboratoires indépendant aux USA et en Grande Bretagne. Chaque centre a utilisé le même protocole. Les résultats du test sur les urines ont été comparés avec les résultats du test à partir de prélèvement urétral. Les résultats du test de blocage et les résultats discordants ont été comparés par la technique d'immunofluorescence.

	Culture cellulaire	
	+	-
MASTAZYME™ +	184	21
CHLAMYDIA -	38	904
Sensibilité	= 82,1 %	
Spécificité	= 97,7 %	
Valeur prédictive positive	= 89,8 %	
Valeur prédictive négative	= 96,0 %	

Une autre étude sur 1.022 urines d'hommes asymptomatiques a montré 70 résultats positifs (6,85 %) confirmés par la culture :

	Culture cellulaire	
	+	-
MASTAZYME™ +	61	18
CHLAMYDIA -	9	934
Sensibilité	= 87,1 %	
Spécificité	= 98,1 %	
Valeur prédictive positive	= 77,2 %	
Valeur prédictive négative	= 99,1 %	

Il est important de noter que les résultats de la sensibilité pourraient être augmentés en reclassant les résultats ELISA faussement négatifs dans la catégorie vrais négatifs car ils étaient aussi négatifs par la culture.

13. Réactions croisées

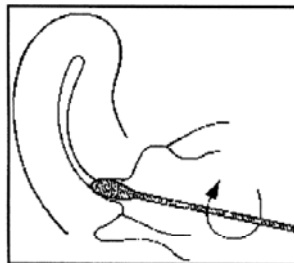
Les micro-organismes suivants, à la concentration de 10^9 UFC/test, n'ont pas montré de réactions croisées avec le test MASTAZYME™ CHLAMYDIA:

Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter Iwoffii*, *Bacteroides biuus*, *Bacteroides capillus*, *Bacteroides fragilis* (3 isolements), *Bacteroides melanogenicus*, *Bacteroides necrophorus*, *Bacteroides nucleatum*, *Bacteroides sphaericus*, *Candida albicans* (7 isolements), *Corynebacterium diphtheriae* (2 isolements), *Clostridium perfringens*, *Clostridium sp.* CytomégaloVirus, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli* (4 isolements), *Gardnerella vaginalis*, *Herpès simplex virus type I et II*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus sp.*, *Moraxella sp.*, *Neisseria gonorrhoeae* (3 isolements), *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, (2 isolements), *Staphylococcus aureus* (6 isolements dont une souche productrice de la protéine A), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Streptococcus sp.* (Groupe A, B et G), *Ureaplasma urealyticum*.

14. Annexe: Prélèvement des échantillons

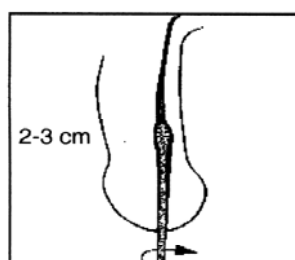
1. Prélèvement endocervical chez la femme (fig 1)

Nettoyer la zone exocervicale avec une compresse ou un écouvillon stérile avant le prélèvement pour éliminer l'excès de mucus. Insérer l'écouvillon approprié dans le canal endocervical et effectuer des rotations vigoureuses pendant 5 à 10 secondes au niveau de l'endocol. Déplacer l'écouvillon en effectuant une rotation vigoureuse puis enlever l'écouvillon sans toucher les parois vaginales et immerger l'extrémité de celui-ci dans un milieu de transport. Agiter vigoureusement, casser la tige de l'écouvillon de manière à laisser son extrémité dans le tube bien rebouché. Inscrire les données du patient sur l'étiquette du tube et transmettre le tube au laboratoire. Les prélèvements peuvent être conservés 8 jours à 2–8 °C ou 6 mois à -20 °C avant utilisation.



2. Prélèvement urétral chez l'homme (fig 2)

Le prélèvement ne doit pas être effectué sur un patient ayant uriné quelques heures avant. Insérer l'écouvillon approprié dans l'urètre (2 à 3 cm de profondeur) en effectuant une rotation de l'écouvillon pendant 10 secondes de manière à ce que toutes les surfaces de l'urètre soient en contact avec l'écouvillon. Immerger l'extrémité de l'écouvillon dans un milieu de transport. Agiter vigoureusement, casser la tige de l'écouvillon de manière à laisser son extrémité dans le tube bien rebouché. Inscrire les données du patient sur l'étiquette du tube et transmettre le tube au laboratoire. Les prélèvements peuvent être conservés 8 jours à 2–8 °C ou 6 mois à -20 °C avant utilisation.



3. Prélèvement ophtalmique

Éliminer soigneusement l'exsudat en excès à la surface des yeux avant le prélèvement. À l'aide d'un écouvillon approprié, appliquer fermement l'écouvillon à la surface interne des paupières supérieures et inférieures. Pour les prélèvements concernant les deux yeux effectuer un écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon pour chaque œil. Immerger l'extrémité de l'écouvillon dans un milieu de transport. Agiter vigoureusement, casser la tige de l'écouvillon de manière à laisser son extrémité dans le tube bien rebouché.

Inscrire les données du patient sur l'étiquette du tube et transmettre le tube au laboratoire. Les prélèvements peuvent être conservés 8 jours à 2–8 °C ou 6 mois à -20 °C avant utilisation.

4. Echantillons d'urine chez l'homme

Collecter 25 mL d'urine du matin (premier jet). Ne pas utiliser de récipient contenant du borate tamponné car cela peut affecter l'acidité de l'échantillon et de ce fait le résultat du test.

Avant de démarrer le test, l'urine doit être traitée ainsi: Vortexer au moins 15 mL d'urine pendant 20 secondes pour bien mélanger puis centrifuger pendant 20 minutes à 2500 g. Après centrifugation remettre en suspension le culot dans 1 mL de milieu de transport MASTAZYME™ CHLAMYDIA.

Ne pas conserver l'urine plus de 24 heures avant le test. L'échantillon d'urine dans le milieu de transport MASTAZYME™ CHLAMYDIA peut être stocké à 2–8 °C pendant 24 heures ou à -70 °C au maximum 3 jours avant le test.

15. Références

1. Grayston JT, Kuo CL *et al.* *Chlamydia pneumoniae* sp. nov for Chlamydia sp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 1989; **39**: 88-90
2. Schachter J. Chlamydia (Psittacosis-Lymphogranuloma Venerum-Trachoma Group) ch 85 in *Manual of Clinical Microbiology* 4th edition Ed Tenet A.S.M. 1985
3. Taylor Robinson D, Thomas BJ. The role of *Chlamydia trachomatis* in genital tract and associated diseases *J Clin Pathol* 1980; **33**: 205-233
4. Brunham RC, Maclean IW *et al.* *Chlamydia trachomatis*; its role in tubal infertility. *J Infect Dis* 1985; **152**: 1275-1282
5. Weström L. Incidence, prevalence and trends in acute pelvic inflammatory disease and its consequence in industrial countries. *Am Obstet & Gynecol* 1980; **138**: 880-892
6. Goh B. *Chlamydia trachomatis* genital infection. *The Practitioner* 1988; **232**: 813-818
7. Alexander ER, Harrison HR. Role of *Chlamydia trachomatis* in perinatal infection. *Rev Infect Dis* 1983; **5**: 713-719
8. Wentworth BB, Judson FN. *Laboratory Methods for Diagnosis of STD*. Am Public Health Ass. 1984.

16. Résumé de la technique

1. Préparer la solution de lavage diluée au 1:30.
2. Sélectionner le nombre utile de barrettes.
3. Agiter au vortex les tubes d'échantillons et de contrôles pendant 15 secondes.
4. Chauffer les échantillons et les contrôles à $100\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ pendant 10 minutes.
5. Laisser refroidir les échantillons et les contrôles à température ambiante.
6. Distribuer 25 μL de conjugué par puits.
7. Agiter les échantillons et les contrôles au vortex.
8. Distribuer 200 μL d'échantillon à tester et 200 μL de contrôle dans leur puits respectifs.
9. Distribuer 50 μL d'anticorps par puits.
10. Recouvrir les barrettes, agiter le contenu et incuber à 37 °C pendant 60 minutes.
11. Laver les puits 5 fois avec la solution de lavage.
12. Distribuer 200 μL de solution de TMB par puits.
13. Recouvrir les puits, agiter le contenu des puits et incuber à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante.
14. Stopper la réaction en déposant 50 μL de solution d'arrêt par puits. Mélanger le contenu des puits par agitation.
15. Effectuer la lecture à 450 nm.
16. Calculer les seuils et évaluer les résultats des échantillons testés.

Hersteller / Manufactured by / Fabriqué par:
(Vertrieb Zentral- und Osteuropa)

MAST DIAGNOSTICA

Laboratoriumspräparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Fon: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
E-Mail: mast@mast-diagnostica.de
<http://www.mast-diagnostica.de>

Distributed by:

MAST GROUP Ltd.
Mast House, Derby Road, Bootle
UK-Mersey Side L20 1EA
Great Britain
Phone: +44 151 9337277
Fax: +44 151 9441332
E-mail: sales@mastgrp.com

<http://www.mastgrp.com>

Distribué per:

MAST DIAGNOSTIC
115, rue Jules Barni
80000 Amiens
France
Phone: +33 3 22808067
Fax: +33 3 22809922
E-mail: service-commercial@mast-diagnostic.fr

<http://www.mastgrp.com>