

MASTAZYME™ CHLAMYDIA

Enzymatická imunoesej pro detekci Chlamydia Antigen

Návod k použití



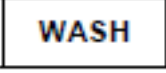




Pouze pro *in vitro* diagnostiku

MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA Kit	REF 695010	96 testů
MASTAZYME™ CHLAMYDIA Transportní médium	REF 695020	95 vialek
MASTAZYME™ CHLAMYDIA Odběrové tampony	REF 695030	100 kusů

Skladujte při 2 – 8 ° C

Vysvětlení zkratk a ikon uvedených na štítcích:

	Mikrotitrační stripy
	Pozitivní kontrola
	Negativní kontrola
	Monoklonální protilátka
	HRP konjugát
	TMB substrát
	Stop roztok
	Promývací pufr
	Šarže
	Číst návod k použití
	Důležitá upozornění
	Datum expirace
	Skladování
	Reagencie nelze použít opakovaně

Obsah	Strana
1. Použití	4
2. Úvod	4
3. Princip testu	4
4. Součásti soupravy	5
5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy	5
6. Upozornění a zvláštní opatření	5
7. Uchovávání a trvanlivost reagensů	6
8. Odběr vzorku a manipulace	6
9. Pracovní postup	6
10. Výsledky a interpretace	8
11. Omezení testu	9
12. Charakteristika testu	9
13. Příloha: Odběr vzorků	11
14. Literatura	12
15. Shrnutí metody	12

1. Použití

Souprava MASTAZYME™ CHLAMYDIA je senzitivní enzymatická imunoesej pro detekci Chlamydiového antigenu ve vzorcích pocházejících ze stěru z endocervixu u žen, mužské uretry a ve vzorcích ze stěru spojivkového vaku. Tato souprava může také sloužit pro analýzu vzorků mužské moče.

2. Úvod

Rod Chlamydia zahrnuje 3 zjištěné druhy: ***Chlamydia trachomatis***, která je patogenní především pro lidi, ***Chlamydia psittaci***, která je patogenní pro ptáky, zvířata a někdy i pro lidi a ***Chlamydia pneumoniae***, která způsobuje respirační infekce a atypické pneumonie u lidí. Všechny chlamydie jsou intracelulární organismy klasifikované jako bakterie.²

C. trachomatis je klinicky jeden z nejdůležitějších patogenů a je hlavní příčinou sexuálně přenosných onemocnění v průmyslově vyspělých zemích.³ Je známo 15 sérotypů.²

Sérotypy A, B, Ba a C jsou původci trachomu - nejčasnější příčinou slepoty, sérotypy L₁, L₂ & L₃ souvisí s Lymphogranuloma venereum, zatímco zbývající sérotypy D-K jsou spojeny s genitálními infekcemi od negonokokových uretritid, cervicitid, vulvovaginitid, proktitid až po neplodnost, z nichž mnohé zůstávají neodhalené a tudíž neléčeny. K závažnějším projevům zánětlivých onemocnění patří salpingitida a mimoděložní těhotenství u žen^{4,5} a epididymitida u mužů. Sérotypy D-K mohou také způsobovat zánět spojivek, punktuální keratitidu a občas zjizvení nebo endemický trachom. Většina z nich vzniká u pacientů s nezachycenými genitálními symptomy.⁶ K novorozeneckým očním komplikacím a onemocnění dýchacích cest může dojít u dětí narozených infikovaným matkám.⁷

Životní cyklus *C. trachomatis* je složitý. Infekce je zahájena uchycením elementárního tělíška na cylindrických epitelových buňkách, do nichž prostoupí endocytózou. Elementární tělíško roste a diferencuje se do retikulárního tělíška.

Ta se pak rozdělí binárním štěpením a po 24-48 hodinách se retikulární tělíška diferencují do expandabilních inkluzí. Vyvrálá inkluze může obsahovat cca. 10⁴ chlamydiových tělíšek.

Rutiní diagnostika infekcí *C. trachomatis* zahrnuje jednu z následujících metod:

- a) Kultivace patientského materiálu na zvířecích buňkách a pozorování obarvených intracelulárních chlamydiových inkluzních tělíšek a vizuální vyšetření. To však trvá nejméně 48 hodin.
- b) Detekce chlamydií hybridizací nukleové kyseliny nebo amplifikací. Výsledky jsou spolehlivé, ale jedná se o drahé vyšetření.
- c) Přímé vyšetření patientského materiálu enzymatickou imunoesejí (EIA) nebo imunoflorescencí. Metoda EIA je rychlá, nezávislá na mikroskopii, a proto je tato metoda volbou mnoha laboratoří.

3. Princip testu

Souprava MASTAZYME™ CHLAMYDIA Antigen ELISA využívá principu jedнокrokové enzymatické imunoeseje. Urogenitální (stěr z endocervixu nebo mužské uretry) nebo vzorky ze stěru spojivkového vaku jsou získány od pacienta a umístěny na MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportní médium. Vzorky moče jsou vortexovány po dobu 20 vteřin a následně centrifugovány po dobu 20 minut při 2500 x g a vzniklá peletka je resuspendována v 1 vialce MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportního média.

Vzorky a kontroly musí být důkladně promíchány, vařeny po dobu 10 minut a následně před použitím vychlazeny. Do předem připravených jamek v mikrotitrační destičce se pipetují jednotlivé složky v dále uvedeném pořadí: (1) anti-myší IgG HRP protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, (2) předem předvařený vzorek nebo kontrola a (3) myší IgG monoklonální protilátka specifická pro chlamydiový lipopolysacharid (LPS).

Po 60 minutové inkubaci při teplotě 37 °C jsou jamky promyty z důvodu odstranění nenavázaného materiálu a konjugovaný enzym (HRP) je detekován přidáním chromogenního substrátu 3,3', 5,5' tetramethylbenzidinu (TMB). Během inkubace produkuje enzymatická reakce modré zbarvení a tato reakce je po určité době zastavena přidáním kyseliny, která způsobí změnu zbarvení z modré na jasně žlutou.

Následně jsou jamky vyhodnocovány spektrofotometricky. Intenzita barevné reakce je přímo úměrná množství Chlamydiového antigenu ve vzorku získaného od pacienta.

Myší monoklonální protilátka je rodově specifická a nerozlišuje mezi *Ch. trachomatis*, *Ch. psittaci* a *Ch. pneumoniae*.

4. Součásti soupravy

1. 12 x Mikrotitrační stripy s 8 odlamovatelnými jamkami, dodávané v rámečku (držáku) a zapečetěné v hliníkovém obalu se sáčkem silikagelu.
2. 4 x Fólie na přikrytí destiček
3. 1 x 5,5 mL Myší monoklonální protilátka specifická pro Chlamydiový lipopolysacharid, naředěná v modře zbarveném roztoku s obsahem PBS pufru, BSA a 0,1 % proclinu jako konzervantu. Připravena k použití.
4. 2 x 3 mL Oví anti-myší IgG protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, naředěná v červeně zbarveném roztoku s obsahem PBS pufru, BSA a 0,1 % proclinu jako konzervantu. Připravena k použití.
5. 4 x 1 mL Pozitivní kontrola, semi-purifikovaný preparát *Ch. trachomatis*, sérovar L2 rostoucí v McCoy buňkách, naředěný v modifikovaném MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportním médiu. Připravena k použití.
6. 4 x 1 mL Negativní kontrola, MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportní médium. Připravena k použití.
7. 2 x 25 mL Promývací pufr, dodávaný 30 x koncentrovaný, složený z: 0,9 % (w/v) NaCl, konečná koncentrace 0,05 % (w/v) Tween 20, konečná koncentrace 0,003 % (w/v) Proclin, konečná koncentrace
8. 1 x 22 mL TMB substrát (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, připraven k použití), reagencie bez DMSO. Připraven k použití.
9. 1 x 12 mL Stop roztok, obsahuje 2M H₂SO₄. Připraven k použití.

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

1. Vortexová míchačka.
2. Laboratorní centrifuga schopná dosáhnout 2500 x g.
3. Termoblok s jamkami o průměru 17-18 mm nebo jiné alternativní zařízení, schopné zahřát vzorky na teplotu 100 °C ± 5 °C, např. vodní lázeň.
4. Přesné mikropipety, a to jak jednorázové, tak multikanálové o objemu 25 µL, 50 µL a 200 µL.
5. Jednorázové špičky na pipety.
6. Destilovaná nebo deionizovaná voda (ultračistá nebo voda pro HPLC).
7. Čisté, standardní, odměrné laboratorní sklo nebo plastové nádoby o objemu 500 mL, 1000 mL nebo 2000 mL.
8. Centrifuga (2500 x g).
9. Inkubátor (37 °C).
10. Manuální promývací systém (stříčka) nebo automatický promývač mikrotitračních destiček.
11. Absorbující papírové ubrousky.
12. ELISA reader se 450 nm filtrem (volitelně: referenční filtr 620 nm).
13. MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportní médium (Kat. číslo 695020).
14. MASTAZYME™ CHLAMYDIA odběrové tampony (Kat. číslo 695030), eventuelně je možné použít pouze odběrové tampony Dacron® pro odběr vzorků z endocervixu a mužské urethry. Nelze používat odběrové tampony se dřevěnou a alginátovou násadkou. Nelze použít ani odběrové tampony s obsahem agarů a uhlíku. (Dacron® je registrovaná ochranná známka DuPont Inc.).

6. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku!
- Čtete pozorně příbalový leták před použitím testu. Neupravujte pracovní postup.
- Nepoužívejte test po uplynutí doby expirace.
- Nezaměňujte reagencie z různých šarží, reagencie jsou kalibrovány pro každý kit.
- Prohlédněte všechny reagencie v kitu před provedením testu. Reagencie by neměly být použity v případě, kdy se objeví jakýkoliv zákal či jsou reagencie podezřelé z jakéhokoli jiného důvodu.
- Všechny reagencie musí být skladovány při 2-8 °C a vytemperovány před jejich použitím na laboratorní teplotu.
- Nepoužívejte jamky opakovaně.

- Nepipetujte ústy.
- Pozitivní kontrola je supernatantní materiál z infikovaných buněk tkáňové kultury a byla prokázána jako neinfekční je-li naočkována na citlivé buněčné kultuře. Přesto s ní po celou dobu zacházejte jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Používejte vysoce kvalitní destilovanou nebo deionizovanou vodu (ultračistou / pro HPLC).
- Nepřenášejte vzorky přímo z -70 °C nebo 2-8 °C do termobloku. Vždy ponechte vzorky vytemperovat na laboratorní teplotu před jejich zahříváním.
- Nedovoďte, aby jamky během testu vyschly.
- Nezahřívajte TMB substrát. TMB substrát je hořlavý. Vyvarujte se kontaktu s kůží, očima a sliznicemi, chraňte před teplem a otevřeným plamenem.
- Chraňte roztok před přímým světlem. Inkubace s TMB substrátem musí být provedena v temném prostředí.
- Stop roztok obsahuje H₂SO₄, která je korozivní. Vyvarujte se kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.
- Použijte jednorázové plastové pomůcky, je-li to možné. Opakovaně použité rukavice by měly být důkladně umyty a opláchnuty vodou bez detergentů před jejich dalším použitím.
- Vyvarujte se kontaminaci reagensů a záměně víček na lahvičkách. Používejte jiné pipety nebo špičky pro každý vzorek a reagensii.
- Vyvarujte se kontaminaci vzorků mezi jamkami. Pokud je při dávkování vzorku či reagensie nakapáno na povrch destičky, potom okamžitě vysušte povrch.
- Musí být dodrženy místní provozní postupy pro manipulaci s potenciálně infekčním materiálem. Vzorky mohou obsahovat potenciálně infekční organismy např. HIV 1, 2, viry hepatitidy. Zahříváním vzorku se mohou inaktivovat viry, jsou-li přítomny. Nicméně, postupujte velmi opatrně po celou dobu manipulace s lidskými vzorky.
- Nakládejte s veškerým klinickým a kontrolním materiálem bezpečně a v souladu s místními předpisy.

7. Uchovávání a trvanlivost reagensů

1. Souprava MASTAZYME™ CHLAMYDIA a všechny komponenty mohou být použity do data expirace uvedeného na obalu, pokud jsou skladovány při teplotě 2-8 °C.
2. Po otevření skladujte reagensie při teplotě 2-8 °C tam, kde je to vhodné.
3. Klinické vzorky mohou být skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu 8 dnů před použitím nebo po dobu 6. měsíců při teplotě -70 °C.
4. Vzorky mužské moče mohou být skladovány po dobu maximálně 24 hodin při teplotě 2-8 °C.
5. Převařené vzorky (odběrové tampony a mužská moč) mohou být skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 24 hodin. Při dlouhodobějším skladování je třeba vzorky skladovat při teplotě -20 °C, kdy jsou stabilní po dobu 4. týdnů.
6. Naředěný promývací pufr může být skladován v důkladně uzavřených nádobkách při teplotě 15-30 °C po dobu 1 měsíce.

8. Odběr vzorku a manipulace

- Tato souprava je určena pro analýzu lidských urogenitálních (vzorky z endocervixu a mužské urethry), očních vzorků a také vzorků mužské moče.
- Nepoužívejte MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportní médium, pokud vykazuje známky kontaminace, např. zákal nebo ztráta jeho typického zbarvení.
- Urogenitální vzorky nebo vzorky z očních výtěrů by měly obsahovat co nejvíce epiteliálních buněk, protože Chlamydie jsou intracelulární organismy, které napadají právě epiteliální buňky.
- Pokud je požadován odběr vzorku pro vyšetření na kapavku, je nutné tento vzorek odebrat dříve, než vzorek pro vyšetření na přítomnost chlamydie, a to za využití zvláštního odběrového tamponu.

9. Pracovní postup

Důležitá poznámka: Následující pořadí pipetovaných složek je naprosto zásadní pro správnou funkčnost soupravy:

1. **Konjugát** (červeně zbarvený roztok)
2. **Vzorek** (vialka s transportním médiem obsahující odběrový tampon) **nebo kontroly**
3. **Monoklonální protilátka** (modře zbarvený roztok)

Ujistěte se, že jsou všechny reagensie na dně jamek v mikrotitrační destičce. Před inkubací opatrně promíchejte reakční mix.

1. Připravte ředění koncentrovaného promývacího pufru v poměru 1:30 za využití ultračisté vody, jak je požadováno nebo naředte celý objem (2 vialky, každá po 50 mL) 1450 mL ultračisté vody.
2. Před dalším pokračováním je nutné všechny reagentie, mikrotitrační destičky a vzorky nechat vytemperovat na pokojovou teplotu.
3. Vzorky a kontroly (1 pozitivní a 1 negativní) vortexujte po dobu 15 vteřin.
4. Zahřívejte všechny vzorky a kontroly na teplotu $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10. minut v termobloku nebo ve varné vodní lázni. Ujistěte se, že jsou povoleny uzávěry na vialkách, ale zároveň, že při vaření nedochází ke vzniku vody do vialek.
5. Po 10 minutách vyjměte vialky a před dalším použitím je vychlaďte na pokojovou teplotu.
6. Připravte si požadované množství mikrotitračních stripů pro provedení testu včetně 3 jamek pro kontroly (2 pro negativní a 1 pro pozitivní kontrolu). Nepotřebné stripy vyjměte z rámečku a vraťte je zpět do plastového skladovacího obalu s obsahem sáčku silikagelu. Obal ihned znovu zalepte.

Důležité: Pipetujte všechny reagentie a vzorky přesně dle pořadí uvedeného níže:

1. konjugát, 2. vzorek, 3. protilátka

7. Pipetujte 25 μL červeně zbarveného konjugátu do každé jamky. Proveďte vizuální kontrolu pro ujištění, že skutečně všechny jamky obsahují konjugát.
8. Vzorky a kontroly vortexujte po dobu 15 vteřin, a poté jich pipetujte 200 μL do předem určených jamek. Zaznamenejte si pozice (umístění) jednotlivých vzorků a kontrol za využití písmen a čísel, která jsou vylisována do držáku stripů.
9. Pipetujte 50 μL modře zbarveného roztoku monoklonální protilátky do každé jamky. Proveďte vizuální kontrolu pro ujištění, že skutečně všechny jamky obsahují protilátku. V této fázi dojde v jamkách ke změně zbarvení na šedivou.
10. Stripy přikryjte dodávanou fólií, aby bylo zabráněno vypařování tekutiny z jamek.
11. Opatrně poklepejte o stěnu rámečku, abyste se ujistili, že jsou všechny komponenty reakce v jamkách dobře promíchány. Dávejte však pozor, aby nedošlo k přesunu obsahu v jamkách na jejich vrchní část. Ve všech jamkách by mělo být přítomno v celém prostoru stejné zbarvení a neměla by být přítomna žádná známka vrstvení reagentií.
12. Inkubujte při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut \pm 3 minuty.
13. Po inkubaci sundejte plastovou krycí fólii a promyjte stripy naředěným promývacím pufrům buď
 - (a) ručně za využití stříčky nebo (b) pomocí automatického promývače. Zabraňte dlouhodobějšímu kontaktu promývacího pufru se dnem jamek
 - a) - Opatrně držte rámeček se stripy a po jemném promíchání vylijte obsah jamek do odpovídající odpadní nádoby.
 - Promyjte jamky alespoň 350 μL promývacího pufru ze stříčky, a poté obsah jamek opatrně vylijte.
 - Promývací krok takto opakujte 5x.
 - Nakonec otočte rámeček se stripy dnem vzhůru a důrazně s ním klepejte o pevnou podložku, na které je umístěn absorpční papírový ubrousek, aby došlo k odstranění zbytkové tekutiny ze dna jamek. Zkontrolujte, zda nezůstala žádná tekutina v jamkách, a poté osušte povrch jamek za využití čistých absorbujících papírových ubrousků.
 - b) - Při využití automatického promývače stripů vyprázdněte a promyjte jamky s alespoň 350 μL promývacího pufru. Promytí opakujte 5x v závislosti na informacích poskytnutých výrobcem promývacího zařízení. Nepoužívejte promývací programy, které zahrnují namáčecí krok.
 - Je velice důležité zkontrolovat, že jsou promývací trysky čisté, nezablockované a že pokaždé dobře plní všechny jamky promývacím roztokem.

- Po promytí otočte rámeček se stripy dnem vzhůru a důrazně s ním klepejte o pevnou podložku, na které je umístěn absorpční papírový ubrousek, aby došlo k odstranění zbytkové tekutiny ze dna jamek. Zkontrolujte, zda nezůstala žádná tekutina v jamkách, a poté osušte povrch jamek za využití čistých absorbujících papírových ubrousků.
14. Pipetujte 200 μ L roztoku TMB (připraven k použití) do každé jamky. Pro tento krok je doporučeno používat multikanálovou pipetu.
 15. Přikryjte stripy dodávaným kouskem plastové fólie, jemně poklepejte na stěnu rámečku, abyste se ujistili, že jsou všechny komponenty reakce v jamkách dobře promíchány. Dávejte však pozor, aby nedošlo k přesunu obsahu v jamkách na jejich vrchní část.
 16. Inkubujte ve tmě, při pokojové teplotě, po dobu 20 minut \pm 2 minuty.
 17. Po inkubaci ukončete reakci přidáním 50 μ L stop roztoku do všech jamek ve stejném pořadí a časovém intervalu tak, jak byl v kroku 14 přidáván roztok TMB substrátu.
 18. Opatrně poklepejte rámečkem, abyste se ujistili, že jsou všechny reagensy dobře promíchány a že žádné nezreagované reagensy neadherovaly na vrchní část stěny v jamce. Vizually zkontrolujte, že je v jamkách homogenní zbarvení a že není přítomna žádná známka vrstvení reagensů.
 19. Do 30 minut od přidání stop roztoku odečítejte výsledky za využití vhodného ELISA readeru se 450 nm nastavením filtru (referenční filtr 620 - 690 nm). Blank odečítejte vůči vzduchu.

10. Výsledky a interpretace

Kritéria pro interpretaci:

- Průměrná hodnota extinkce negativní kontroly by měla být menší než 0,2 OD hodnot.
- Hodnota extinkce pozitivní kontroly by měla být vyšší než 0,7 OD hodnot.
- Pokud negativní a pozitivní kontroly nesplňují tato kritéria, výsledky testu by neměly být interpretovány a test musí být zopakován.
- Pro zjištění OD hodnot specifických pro danou šarži viz. "Certificate of Kit Performance", který je součástí balení.

1. Výpočet výsledků

- a) Vypočítejte průměrnou hodnotu absorbance naměřené u negativních kontrol.
- b) Vypočítejte cut-off hodnotu následovně:
Cut-off = střední absorbance negativních kontrol + 0,1
- c) Vypočítejte horní limit pro hraniční oblast následovně:
Horní limit = cut-off hodnota + 0,05

2. Validace testu

- a) Průměrná hodnota absorbance pro negativní kontroly by měla být nižší než 0,20.
- b) Hodnoty absorbance pozitivních kontrol by měly být hodnoceny výše než 0,7.
Pokud nejsou splněna tato kritéria, test je považován za nevalidní a měl by být zopakován.

3. Interpretace výsledků

- a) Vzorek s hodnotou absorbance vyšší než horní limit pro hraniční oblast je považován za pozitivní.
- b) Vzorek s hodnotou absorbance odpovídající hornímu limitu pro hraniční oblast nebo s hodnotou absorbance nižší, je považován za negativní.
- c) Vzorek s hodnotou absorbance mezi cut-off hodnotou a horním limitem je považován za hraniční a měl by být znovu analyzován. Při opakovaném testování, vzorky ani kontroly nepřevářejte.
- d) Pokud vzorek opakovaně poskytuje hraniční výsledky, měl by se od pacienta odebrat vzorek

nový, a ten podrobit nové analýze.

- e) Převažené vzorky ze stěrů a vzorky mužské moče, u kterých je třeba provádět konfirmační vyšetření a kontroly, mohou být skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 24. hodin nebo při teplotě -20 °C po dobu 4. týdnů.

11. Omezení testu

1. Soupravou MASTAZYME™ CHLAMYDIA nelze vyšetřovat vzorky z rekta.
2. Výsledky testů by měly být interpretovány spolu s výsledky klinického vyšetření.
3. Negativní výsledky nutně neznamenají nepřítomnost chlamydiové infekce. Počty organismů nižší než je detekční limit testu a také nevhodný odběr vzorku může způsobit falešně negativní výsledky. Je doporučeno kultivování vzorku, jestliže je stále podezření na přítomnost chlamydiové infekce.
4. U soupravy MASTAZYME™ CHLAMYDIA nebylo posouzeno její použití u pacientů pro určení je jejich odpovědi na léčbu.
5. Výsledky testů u populace s nízkou prevalencí by měly být interpretovány s opatrností a s ohledem na klinická vyšetření.
6. Diagnóza chlamydiové infekce ve forenzních případech např. znásilnění nebo zneužívání dětí, by mělo být provedeno pomocí tkáňové kultury.

12. Charakteristika testu

1. Senzitivita a specificita

a) Vzorky z mužské uretry a z ženského endocervixu

Souprava MASTAZYME™ CHLAMYDIA byla testována na 2040 vzorcích ve čtyřech nezávislých klinických centrech v UK a USA. Vzorky byly náhodně vybrány od populace s vysokým výskytem STD onemocnění s incidencí nebo prevalencí v rozmezí 9.86% - 16.63%. Výsledky byly porovnány s kultivací pomocí McCoy buněk, s diskrepantními výsledky, které byly dále testovány přímou imunoflorescencí zcentrifugovaných nasbíraných vzorků určených pro vyhodnocení soupravou MASTAZYME™ CHLAMYDIA. Celková přesnost soupravy MASTAZYME™ CHLAMYDIA oproti kultivaci byla 96.8%.

Celkový počet pozitivních byl rozdělen v průměru takto - 1 muž na 2 ženy, byl zde malý rozdíl u 2 různých skupin. Společné údaje byly takovéto:

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

b) Oční vzorky

173 očních vzorků bylo testováno soupravou MASTAZYME™ CHLAMYDIA na nezávislém klinickém pracovišti. Vzorky byly nasbírány od symptomatických dospělých jedinců s prevalencí chlamydiové infekce 13.8%. Byly získány následující údaje:

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

c) Vzorky mužské moče

Soupravou MASTAZYME™ CHLAMYDIA bylo testováno 1147 vzorků, z toho 222 (19.4%) které byly identifikovány jako pozitivní při kultivaci na třech různých klinických centrech v UK a USA.. Všechna centra použila stejné protokoly. Výsledky MASTAZYME™ CHLAMYDIA ELISA testem na prvních vzorcích mužské moče byly porovnány s výtěry z uretry testovanými také MASTAZYME™ CHLAMYDIA soupravou a odlišné výsledky byly dále zkoumány pomocí přímé imunofluorescence. Byly zjištěny následující údaje:

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

Další studie 1022 vzorků moče od asymptomatických mužů, kde 70 (6.85%) bylo identifikováno jako pozitivních při kultivaci, poskytla následující údaje:

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

Je třeba zdůraznit, že údaje o senzitivitě by mohly být zlepšeny opětovnou klasifikací EIA nekonfirmovaných negativních výsledků a jejich následným potvrzením jako opravdu negativních, kde výsledky z přímé imunofluorescence byly také negativní.

2. Zkřížená reaktivita

Následující organismy nebyly shledány jako reaktivní v MASTAZYME™ CHLAMYDIA testu, pokud byly přítomny v počtu přibližně 10^9 CFU/ test:

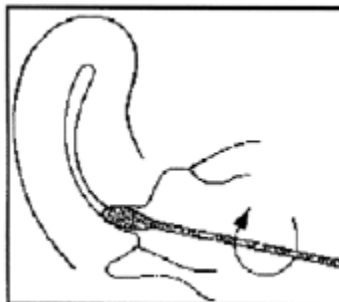
Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacteroides bluu*s, *Bacteroides capillus*, *Bacteroides fragilis* (3 izoláty), *Bacteroides melanogenicus*, *Bacteroides necrophorus*, *Bacteroides nucleatum*, *Bacteroides sphaericus*, *Candida albicans* (7 izolátů), *Corynebacterium diphtheriae* (2 izoláty), *Clostridium perfringens*, *Clostridium spp.*, *Cytomegalovirus*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli* (4 izoláty), *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex Viruses types I & II*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus sp*, *Moraxella sp*, *Neisseria gonorrhoea* (3 izoláty), *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (2 izoláty), *Staphylococcus aureus* (6 izolátů, jeden Protein A - produkce kmenu), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus sp.* (skup.A,B a G), *Ureaplasma urealyticum*.

13. Příloha: Odběr vzorků

1. Vzorky z ženského endocervixu (Obr.1)

Před odběrem vzorku očistěte od přebytečného hlenu exocervikální oblast pomocí sterilní gázy nebo tamponu. Do endocervikálního kanálu zaveďte příslušný odběrový tampon a energicky s ním otáčejte na povrchu epitelální sliznice po dobu 5 – 10 vteřin. Přemístěte odběrový tampon do tzv. portio oblasti a opět s ním energicky otáčejte. Poté opatrně vyjměte odběrový tampon, aniž byste se s ním dotkli vaginální stěny, odlomte násadky s odběrovým tamponem a vložte ho do MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportního média a vialku důkladně uzavřete.

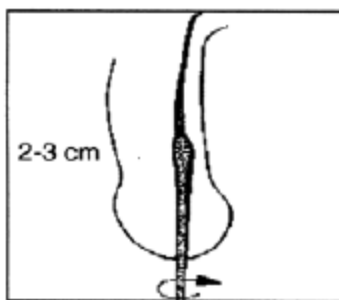
Na štítek vialky s transportním médiem zaznamenejte údaje o pacientovi a vialku s odebraným vzorkem zašlete do laboratoře. Před analýzou mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 8 dnů a při -70 °C po dobu až 6. měsíců.



2. **Vzorky z mužské urethry (Obr.2)**

Vzorky by neměly být odebírány v případě, že v čase do 1 hodiny před provedením odběru vzorku muž močí. Zaveďte příslušný odběrový tampon (vhodný pro výtěr urethry u mužů) 2 – 3 centimetry do urethry a otáčejte s ním po dobu 10 vteřin tak, aby byl zajištěn jeho kontakt se všemi vnitřními povrchy urethry. Poté opatrně vyjměte odběrový tampon, odlomte vršek násadky s odběrovým tamponem a vložte ho do MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportního média a vialku důkladně uzavřete.

Na štítek vialky s transportním médiem zaznamenejte údaje o pacientovi a vialku s odebraným vzorkem zašlete do laboratoře. Před analýzou mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 8 dnů a při -70 °C po dobu až 6. měsíců.



3. **Vzorky z výtěru oka**

Před odběrem opatrně odstraňte přebytečný exudát z povrchu oka. Za využití odpovídajícího odběrového tamponu, proveďte důkladný výtěr vnitřního povrchu spodního spojivkového vaku, a poté i horního spojivkového vaku. Pokud jsou vzorky odebírány z obou očí, je nutné používat pro každé oko samostatný odběrový tampon. Poté odlomte vršek násadky s odběrovým tamponem a vložte ho do MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportního média a vialku důkladně uzavřete.

Na štítek vialky s transportním médiem zaznamenejte údaje o pacientovi a vialku s odebraným vzorkem zašlete do laboratoře. Před analýzou mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 8 dnů a při -70 °C po dobu až 6. měsíců.

4. **Vzorky mužské moče**

Odeberte 25 mL moče, pocházející z prvního proudu při močení. Nepoužívejte sběrné nádoby s možným obsahem boritanů, z důvodu jejich vlivu na aciditu vzorku, a tudíž i nepříznivému vlivu na výsledky testů.

Před použitím moče k testování je nutné ji upravit následovně: minimálně 15 mL vzorku moče vortexujte po dobu 20 vteřin, aby došlo k jejímu promíchání, poté centrifugujte při 2500 x g po dobu 20 minut. Po centrifugaci je vzniklá peletka resuspendována v 1 vialce (1 mL) MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportního média.

Nezpracované vzorky moče mohou být skladovány při teplotě 2-8°C po dobu nepřesahující 24 hodin. Resuspendované vzorky moče ve vialce s obsahem MASTAZYME™ CHLAMYDIA transportního média, mohou být před analýzou skladovány při teplotě 2-8°C po dobu 24 hodin nebo při -70°C po dobu až 3. dnů.

14. Literatura

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 Venereum – Trachoma Group) ch 85 in *Manual of Clinical Microbiology* 4 th edition Ed Lenette A.S.M. 1985
3. Taylor Robinson D, Thomas BJ. The role of *Chlamydia trachomatis* in genitál 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. Shrnutí metody

1. Připravte promývací pufr o pracovní koncentraci 1:30.
2. Připravte si požadované množství mikrotitračních stripů.
3. Všechny vzorky a kontroly vortexujte po dobu 15 vteřin.
4. Zahřejte všechny vzorky a kontroly na teplotu 100°C ± 5°C po dobu 10 minut.
5. Nechte všechny vzorky a kontroly vytemperovat na laboratorní teplotu.
6. Do každé jamky pipetujte 25 µL konjugátu.
7. Všechny vzorky a kontroly vortexujte.
8. Pipetujte 200 µL testovaných vzorků nebo kontrol do předem určených jamek.
9. Do každé jamky pipetujte 50 µL modře zbarveného roztoku protilátky.
10. Jamky přikryjte dodávanou folií, promíchejte obsah jamek a inkubujte při 37°C po dobu 60 minut ± 3 minuty.
11. Promyjte všechny jamky 5x alespoň 350 µL promývacího pufru.
12. Pipetujte 200 µL roztoku TMB substrátu do každé jamky.
13. Přikryjte jamky dodávanou folií a inkubujte v temnu při laboratorní teplotě po dobu 20 minut ± 2 minuty.
14. Ukončete reakci přidáním 50 µL stop roztoku do všech jamek. Obsah jamek promýchejte.
15. Za pomoci ELISA readeru vyhodnoťte jamky při 450 nm.
16. Vypočítejte cut off hodnotu, hraniční hodnoty a posuďte stav testovaného vzorku.

MASTAZYME™ CHLAMYDIA – 2007-07-03