



SeroELISA™ Chlamydia TRUE IgM

Dosage par la Méthode ELISA (ELISA) destiné à détecter les anticorps IgM spécifiques dirigés contre les *Chlamydiae* présents dans le sérum humain

Mode d'Emploi

Trousse de test prévue pour 96 déterminations (N° 112-01 du Catalogue)

Destiné au Diagnostic in Vitro
Pour usage professionnel uniquement
A conserver entre 2 et 8°C.

Ne pas congeler

Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL

Tel: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-Mail: support@savyondiagnosics.com

Usage Prévu

La trousse de test SeroELISA™ des IgM anti-Chlamydia est conçue pour la détection des anticorps IgM spécifiques dirigés contre les Chlamydiae présents dans un seul échantillon de sérum humain par la méthode ELISA.

Destiné au Diagnostic *In Vitro*.

Introduction

Chlamydia est une bactérie intracellulaire obligatoire gram négatif responsable de pathologies aiguës et chroniques chez les mammifères et les espèces aviaires. Le genre Chlamydia est composé de quatre espèces : *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* et *C. pecorum*.

C. trachomatis se divise en 15 sérotypes (1). Les sérotypes A, B, Ba et C sont les agents du trachome (2), le facteur responsable de la cécité endémique, qui peut être prévenue et qui sévit dans les pays du tiers monde. Les sérotypes L₁-L₃ sont les agents du lymphogranuloma venereum. Les sérotypes D-K sont la cause la plus fréquente de l'infection génitale sexuellement transmissible à travers le monde : cervicite, endométrite/salpingite (3) chez la femme et urétrite (4) chez l'homme et chez la femme. Les endométrites/salpingites peuvent induire une occlusion tubaire associée à un risque supérieur de grossesse extra utérine et d'infertilité. L'infection génitale peut être responsable d'une infection aiguë et persistante éventuellement sans aucun symptôme clinique. Généralement, ces infections peuvent être traitées dès qu'elles sont diagnostiquées. Toutefois, en absence de tout

traitement l'infection peut évoluer vers une inflammation chronique sévère conduisant à une infertilité, à une grossesse ectopique, à des avortements à répétition et à des naissances prématurées. De plus, les nourrissons de mères infectées peuvent contracter l'infection lors de la naissance, ce qui peut conduire à des conjonctivites ou à des pneumonies (5).

C. pneumoniae est, chez l'homme, un agent pathogène des voies respiratoires important qui est responsable de plus de 10% des cas de pneumonies communautaires. On a montré que cette bactérie était associée à des maladies respiratoires aiguës, à la pneumonie, à l'asthme, aux bronchites, aux pharyngites, au syndrome pulmonaire aigu de la drépanocytose, à l'insuffisance coronarienne, et au syndrome de Guillain-Barre (6).

C. psittaci affecte une grande variété d'espèces hôtes, allant des mollusques aux oiseaux et aux mammifères, et provoque aussi des pneumonies sévères.

Des tests de sérodiagnostic, qui reposent sur des marqueurs immunologiques spécifiques, servent d'outil de diagnostic non-invasif pour identifier à la fois les infections distales et les infections profondes (7).

Il a été observé que les anticorps (IgM) ANTI-Chlamydia présentent un intérêt sur le plan diagnostique dans les pneumonies provoquées par *C. pneumoniae* (TWAR) et *C. psittaci* (8). Le profil sérologique des IgM de Chlamydia dans les pneumopathies inflammatoires à chlamydiae est le suivant : des anticorps sont produits aux stades précoces d'une infection, atteignant un pic au bout de 1 à 2 semaines et diminuent généralement progressivement jusqu'à des taux indétectables au bout de 2 à 3 mois (11).

Ce profil a été observé chez 20 à 50% des nourrissons nés de mères qui présentaient des cultures positives pour *Chlamydia trachomatis* et/ou qui présentaient des taux élevés d'anticorps IgG et IgA spécifiques dirigés contre Chlamydia. Ces nourrissons développèrent une pneumopathie inflammatoire chlamydiale au cours des 6 premiers mois de leur vie (7).

Comme les IgM ne sont présentes que dans la maladie aiguë et/ou récente (9), le test permettant de déceler les IgM anti-Chlamydia ne nécessite qu'un seul échantillon de sérum et il est possible d'exprimer les résultats en termes de présence ou d'absence d'anticorps IgM.

Des titres élevés d'anticorps IgG, qui entrent en compétition avec les anticorps IgM pour les mêmes sites antigéniques, peuvent donner lieu à des résultats d'IgM faussement négatifs. Le facteur rhumatoïde (Rf, activité auto-immune) est responsable de résultats d'IgM faussement positifs (10). En conséquence, il est essentiel de débarrasser le sérum des IgG/Rf faisons partie de procéder au dosage des IgM.

Le test SeroELISA™ permettant de déceler Chlamydia est fondé sur le sérotype L₂ de *C. trachomatis* à large réactivité antigénique. Il permettra de détecter les anticorps de *C. trachomatis*, *C. psittaci* et *C. pneumoniae* (TWAR).

Principe du Test

- Le sérum humain à analyser est mis en contact avec la substance antigénique dont sont revêtus les puits de microtitration. L'anticorps spécifique, lorsqu'il est présent dans le sérum du patient, se lie à l'antigène fixé, un complexe se forme et tous les composants sériques non

spécifiques sont éliminés par lavage dans la phase de lavage.

- De la peroxydase de raifort (PR) conjuguée à des IgM anti-humaines (spécifiques de la chaîne μ) est ajoutée dans les puits. Si au cours de l'étape précédente un complexe antigène-anticorps s'est formé, l'anticorps conjugué à la peroxydase se liera à la portion de l'anticorps du complexe. Si au cours de l'étape précédente, il ne s'est pas formé de complexe antigène-anticorps, le conjugué est éliminé par lavage dans la phase de lavage.
- Du substrat TMB est ajouté. Une réaction positive est signalée par une couleur allant du bleu au bleu profond qui se développe dans les puits du test à la suite de la réaction enzymatique de la portion de la peroxydase avec le peroxyde et le réactif du chromogène. Ensuite la réaction enzymatique est arrêtée par adjonction d'une solution acide. L'absorption des puits du test est déterminée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- L'absorption à 450 nm donne des indications sur le titre des IgM anti-Chlamydia présentes dans les échantillons sériques des patients.

Technique de Dosage

1. Antigène de Chlamydia Fixé à la Phase Solide (Ag) + Sérum réagissant positivement aux IgM Anti-Chlamydia (Ab_1)

↓
Complexe AgAb₁

2. Complexe AgAb₁ + IgM (Ab_2) anti-humaines conjuguées à la PR

↓
Complexe AgAb₁Ab₂

3. Complexe AgAb₁Ab₂ + Substrat TMB

↓
Solution Bleue

↓ ← Solution d'Arrêt du Chromogène
Solution Jaune (Détermination de l'Absorption à 450 nm)

Avertissement et Précautions

- Avertissement:** LA SUBSTANCE ANTIGENIQUE DE CHLAMYDIA A ETE INACTIVEE ET NE CONTIENT PAS D'ORGANISMES VIVANTS DETECTABLES. TOUTEFOIS, IL FAUT MANIPULER ET ELIMINER LES BARRETTES COMME S'IL S'AGISSAIT D'UN MATERIEL DE LABORATOIRE POTENTIELLEMENT DANGEREUX SUR LE PLAN BIOLOGIQUE.
- Précautions:** Ce kit contient des sérums humains qui ont été testés par des techniques approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) –Ils ont été trouvés dépourvus d'antigène HBs,d'ac VIH 1 et 2, et anti HCV ,comme aucune technique ne peut garantir l'innocuité absolue des matériels testés ,ceux-ci doivent donc être manipulés comme potentiellement infectieux- selon les recommandations publiées dans le manuel « Sécurité biologique dans les laboratoires de microbiologie et de

biologie médicale, 1988 » de CDC/NIH (National Institute of Health - Institut National de la Santé américain).

- La Solution de Substrat/Chromogène est un produit irritant pour la peau et les muqueuses. Eviter tout contact direct.
- Destiné au Diagnostic *In-vitro*.**

Contenu de la Trousse

- Plaque pour microtitration préalablement enduite (96 puits par unité). Chaque sachet contient une plaque de microtitration comprenant 12 barrettes amovibles dans un cadre en plastique. Chaque barrette est enduite d'antigènes de Chlamydia. **1 Unité**
- Témoin Positif (sérum humain positif vis-à-vis des anticorps IgM anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi. **1 Fiole, 2,0ml**
- Témoin négatif (Sérum humain négatif vis-à-vis des anticorps IgM anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi. **1 Fiole, 2,0ml**
- IgM Anti-Humaines Conjuguées à de la PR (spécifiques de la chaîne μ). Prêt à l'emploi. **1 Fiole, 10ml**
- Diluant pour Sérum IgM, Prêt à l'emploi. **2 Flaçon, 60ml**
- Tampon de Lavage Concentré (x20). **1 Flaçon, 100ml**
- Substrat TMB, Prêt à l'emploi. **1 Fiole, 16ml**
- Solution d'arrêt (1M H₂SO₄), Prête à l'emploi. **1 Flaçon, 16ml**
- Couvercle de Plaque. **1 Unité**
- Mode d'Emploi. **1**

Matériel Nécessaire mais Non Fourni

- Tubes à essais et portoirs pour effectuer les dilutions des sérums de patients.
- Micropipettes réglables ou pipettes multicanaux (gammes de 5-50, 50-200 et 200-1000 μ l) et embouts jetables.
- Pipettes en plastique jetables (tailles assorties) et dispositifs de sécurité pour pipeter.
- Une fiole jaugée d'un litre.
- Une éprouvette graduée de 50ml.
- Un laveur ou un flacon de lavage pour les plaques ELISA.
- Serviettes en papier ou papier absorbant.
- Un mélangeur Vortex.
- Un bain-marie à 37°C équipé d'un couvercle, ou une chambre humide placée dans un incubateur à 37° \pm 1°C.
- Lecteur de test ELISA équipé d'un filtre de 450 nm.
- Eau distillée ou désionisée pour la dilution du Tampon de Lavage Concentré.

Conservation et Durée de Conservation des Réactifs

Tous les produits fournis doivent être conservés entre 2° et 8°C. S'ils sont conservés entre 2°et 8°C les réactifs du test sont stables jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'emballage de la trousse. Une exposition des composants

qui au départ étaient scellés ou dotés d'un bouchon à la température ambiante pendant quelques heures n'endommagera pas les réactifs. **NE PAS CONGELER!**

Lorsqu'une trousse est entamée, la durée de conservation du produit d'origine est de 60 jours à partir du premier jour d'ouverture. Une fois ouvert, le sachet en papier d'aluminium contenant les barrettes doit être scellé avec une bande adhésive. Il ne faut pas retirer le petit paquet de produit déshydratant.

Il est possible que des cristaux se forment durant la conservation de la solution de lavage concentrée (20x). Redissoudre les cristaux en plaçant le tampon à +37°C avant dilution. Une fois diluée, la solution reconstituée est stable pendant 21 jours si elle est conservée entre +2°C et +8°C.

Collecte des Echantillons

Il faut prélever les échantillons de sérum de façon aseptique et les conserver entre 2° et 8°C en présence d'azote de sodium 0,05% (NaN₃) comme conservateur au cas où ils devraient être analysés quelques jours plus tard. Pour des périodes plus longues, il faut conserver des fractions aliquotes des échantillons de sérum à -20°C.

Il est fortement conseillé de tester des échantillons sériques limpides et non hémolysés car ils sont susceptibles de donner des résultats moins reproductibles.

Technique de Dosage

Remarques :

- Les composants de cette trousse ont été testés comme formant une unité indissociable. Ne pas mélanger les composants issus de différents lots de trousse ou de trousse provenant d'autres fabricants.
- La température de tous les réactifs doit être équilibrée avec la température ambiante avant leur utilisation. Le Diluant pour Sérum et le Diluant pour Conjugué deviennent gélatineux lorsqu'ils sont réfrigérés. Si cela s'avère nécessaire, il est possible d'accélérer la liquéfaction en chauffant ces composants à 37°C pendant plusieurs minutes.
Des cristaux de sel peuvent se former dans le Tampon de Lavage Concentré lorsque celui-ci est conservé entre 2° et 8°C. Il faut dissoudre de nouveau complètement ces cristaux en les chauffant à 37°C avant la dilution.
- Ne pas réaliser le test en présence de vapeurs réactives (par exemple des vapeurs se dégageant de substances acides, alcalines ou aldéhydiques) ou de poussière, dans la mesure où l'activité enzymatique des IgM Anti-Humain conjuguées à la PR peut être affectée.
- Ne pas toucher la surface des barrettes. Ne pas toucher les bords des puits avec les embouts de la pipette au moment de distribuer les réactifs.
- Utiliser des pipettes à embouts jetables. Eviter la contamination croisée entre les réactifs.
- Tapoter sur la surface du flacon pour libérer le liquide qui pourrait être retenu dans le bouchon.
- Eviter de piéger des bulles d'air dans les puits.
- Répartir les liquides lentement afin d'éviter toute projection.
- Les sérums du Témoin Positif et du Témoin Négatif doivent être traités avec les échantillons de sérums à chaque fois que le test est réalisé.
- A chaque test, il faut consacrer un puits par test pour disposer d'une valeur de blanc.
- Toutes les étapes de la technique doivent être réalisées séquentiellement sans interruption.

Technique du Test - Manuelle

Procédure sur automate disponible sur demande

A) Prélavage des bandelettes réactives

Le prélavage des bandelettes avant de commencer le test est vivement conseillé pour diminuer le signal de base.

- Retirez le nombre nécessaire de bandelettes de leurs sachets en aluminium et insérez-les dans la plaque encadrée.
- Diluer la solution de lavage concentré 1 :20 avec de l'eau distillée. Pour 100 ml de solution de lavage, utilisez 5 ml de solution de lavage concentré et 95 ml d'eau distillée. Mélangez bien.
La solution de lavage diluée doit être préparée juste avant son utilisation et l'excès doit être éliminé.
- Laver les bandelettes avec la solution de lavage, puis jeter le contenu des bandelettes. Répétez cette étape une fois de plus.
- Séchez le haut des bandelettes et le cadre en les tapotant doucement sur du papier absorbant propre.

B) Incubation des Echantillons de Sérum et des Témoins

- Diluer chaque sérum de patient au 1/105 avec le diluant pour sérum comme suit : Ajouter 10 µl de sérum de patient à 200 µl de diluant pour sérum (1/21), et diluer ensuite en ajoutant 25 µl de dilution au 1/21 à 100 µl de diluant du sérum.

Note : Le diluant pour sérum contient des anticorps anti-IgG humains pour supprimer les IgG du sérum.

Les contrôles sont fournis prêts à l'emploi et ne doivent pas être dilués.

- Déposer à l'aide d'une pipette 50µl de Témoin Positif, de Témoin Négatif (Prêt à l'emploi) et d'échantillon sérique (dilution de 1:105) dans les puits distincts correspondants des barrettes.
Déposer à l'aide d'une pipette 50µl de Diluant pour Sérum IgM dans un puits réservé à la valeur du blanc.
L'opération de pipetage des échantillons témoins et sériques dans les puits ne doit pas durer plus de 10 minutes.
- Couvrir les barrettes avec un couvercle de plaque et mettre à incuber pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide.
- Jeter le liquide contenu dans les puits. Laver les puits **cinq** fois et égoutter les comme dans les étapes A).

C) Incubation en présence de Conjugué

- Déposer à la pipette de 50µl de solution de travail d'IgM Anti-Humaines conjuguées à la PR dans chaque puits.
- Couvrir les barrettes avec un couvercle de plaque et mettre à incuber pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide.
- Jeter le liquide contenu dans les puits, laver les **cinq** fois et égoutter les comme dans les étapes A).

D) Incubation en présence de Substrat-TMB

- Déposer à la pipette 100µl de Substrat-TMB dans chaque puits.
- Couvrir les barrettes avec un couvercle de plaque et mettre à incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'une solution d'arrêt pour chromogène dans chaque puits.

Déposer la solution d'arrêt pour chromogène selon la même séquence et en respectant les mêmes intervalles de temps que pour le Substrat-TMB.

15. Etalonner le spectrophotomètre sur le puits contenant le blanc. Déterminer l'absorption à 450nm et enregistrer les résultats.

Il est recommandé de déterminer l'absorption immédiatement mais ce n'est pas obligatoire. La détermination de l'absorption ne doit pas durer plus de 30 minutes, après l'arrêt de la réaction du chromogène.

Critères d'acceptabilité du Test

Le test est valide si:

- L'absorption du Témoin Positif est $\geq 0,8$ à 450nm
- L'absorption du Témoin Négatif est $\leq 0,15$ à 450nm

Si ces conditions ne sont pas remplies, le test n'est pas valide et doit être réalisé de nouveau.

Calcul de la Valeur Seuil (CVS)

La valeur seuil se calcule selon la formule suivante :

$$CVS = 0,24 \times (Pc - Nc) + Nc$$

Pc = Absorption du Témoin Positif à 450 nm

Nc = Absorption du Témoin Négatif à 450 nm

Interprétation des Résultats du Test

Absorption à 450nm	Résultat	Interprétation des Résultats
Inférieure au CVS-0,03	Négatif	Aucun anticorps IgM dirigé contre Chlamydia n'est décelable
CVS \pm 0,03	Equivoque	Refaire le test sur les échantillons de sérum jugés équivoques. Si le résultat est encore équivoque, il est recommandé de procéder à un test sur de nouveaux échantillons de sérum
Supérieure au CVS +0,03	Positif	Signe d'une infection chlamydiale aiguë et/ou récente

Limites du Dosage

- Un test sérologique unique ne peut être utilisé comme seul critère de diagnostic. Toutes les données cliniques et biologiques doivent être prises en compte.
- Le test est un test ELISA à un seul sérotype (L₂). L₂ comprend des déterminants antigéniques qui existent dans les sérotypes de *Chlamydia trachomatis* ainsi que l'antigène du groupe. Des anticorps dirigés contre *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) et *Acinetobacter calcoaceticus* peuvent être détectés par ce test ELISA.
- Ce test ne fournira pas d'indications sur le site de(s) l'infection(s) par chlamydia(s). Il n'est pas supposé remplacer l'isolement sur culture cellulaire, si celui-ci est disponible.

- Comme une infection à Chlamydia peut ne pas donner lieu à des symptômes significatifs immédiats, la phase aiguë peut passer inaperçue et il se peut que les anticorps IgM ne soient pas décelables. Ceci n'exclut pas la présence d'une infection chlamydiale.
- Un sérum contaminé par des bactéries ou un sérum hyperlipémique peut donner lieu à des résultats erronés.

Caractéristiques des Performances

On a comparé le test SeroELISA™ pour IgM anti-Chlamydia au test IPAzyme™ pour TRUE IgM anti-Chlamydia (Produit de la Société Savyon Diagnostics, N° de Cat. 012-01) qui est test sérologique reconnu pour déceler la présence des anticorps IgM dirigés contre Chlamydia.

La population ayant fait l'objet de l'étude comprenait des patients chez lesquels des infections dues à Chlamydia étaient suspectées ainsi que des individus sains (n=162). Les résultats sont résumés de la manière suivante :

Comparaison du test SeroELISA™ et du test IPAzyme™

SeroELISA™	Positif	Négatif	Total
IPAzyme™			
Positif	76	4	80
Négatif	4	78	82
Total	80	82	162

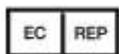
Concordance globale : $(154/162) \times 100 = 95,1\%$

Réactions croisées

Des patients hospitalisés, infectés par des agents pathogènes: *Neisseria gonorrhoea*, *Staphylococcus aureus*, et 3 ainsi que par *Adenovirus* et *Peptostreptococcus anaerobiius* diagnostiqués par des tests sérologiques commercialisés, ont été aussi étudiés avec la SeroELISA Chlamydia. La plupart des sérums ont été trouvés négatifs, il n'a pas été détecté de réactions croisées significatives.

Bibliographie

1. **Yuan, Y., Zhang, Y. X., Watkins, N. G. and Caldwell, H.D.** (1989). Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. *Infection and Immunity*. **57**:1040-1049. Copyright 1989, American Society for Microbiology.
2. **Trehanne J. D.** (1985). The community epidemiology of trachoma. *Rev Infect Dis*. **7**:760-763.
3. **Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V.** (1985). Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. *Eur. J. Epidemiol* **1**: 110-116.
4. **Wang, S.P., Grayston, J.T., Kuo, C.C., Alexander, E.R., and Holmes, K.K.** (1977). SeroDiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the microimmunofluorescence test. In: *Nongonococcal urethritis and related infection*, D. Hobson and K.K. Holmes (Eds), P. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 237-248.
5. **Thompson III S. E., and Dretler R. H.** (1982). Epidemiology and Treatment of Chlamydial Infections in Pregnant Women and Infants. *Review of Infectious Diseases* **4**:S747
6. **Saikku P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Ekman, M.R., Makela, P.H., and Valtonen, V.** (1988). Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infection. *Lancet II*: 983-986.
7. **Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, V., Vaananen, P. and Makela, P.H.** (1984). Chlamydia Pneumonitis and its Serodiagnosis in Infants. *J. Infect. Dis.* **149**:598-604.
8. **Grayson, J.G.** (1989). Chlamydia pneumoniae, Strain TWAR. *Chest* **95**:664-669.
9. **Gardner, P.S. Rapid Virus Diagnosis. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds).** Immunoassays for the 80s, pp. 353-360 MTP Press Limited 1981.
10. **Chantler, S. and Diment, J.A.** current Status of Specific IgM Antibody Assays. In Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. (Eds). Immunoassays for the 80s, pp. 417-430 MTP Press Limited 1981.
11. **Numazaki, K., Chiba, S., Yamanaka, T., Moroboshi, T., Aoki, K., Nakao, T.** (1985). Detection of IgM Antibodies against *Chlamydia trachomatis* by Enzyme Linked Fluorescence Immunoassay. *J.Clin. Pathol.* **38**:733-739



Obelis s.a. (European Authorized Representative Center)
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, Belgium
Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03
e-mail: mail@obelis.net