

RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM

REF KGM3101



1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Ce test RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM est un test immunoenzymatique destiné à la détermination des anticorps IgG ou IgM dirigés contre toutes les espèces de Chlamydia (C.) dans le sérum humain.

Le test doit être utilisé à des fins de confirmation en cas de suspicion d'infection par Chlamydia ou pour clarifier l'état immunitaire.

2. Résumé et explication du test

Le groupe des Chlamydia renferme trois agents pathogènes pour l'homme : Chlamydia trachomatis, Chlamydophila psittaci et Chlamydophila pneumoniae.

Chlamydia trachomatis est l'agent pathogène le plus fréquemment transmis par voie sexuelle et provoque souvent une uréthrite, une cervicite ou une salpingite. Les nouveau-nés de mères infectées peuvent développer une conjonctivite ou une pneumonie. Certains sérotypes provoquent des lymphogranulomatoses vénériennes. D'autres sérotypes provoquent une conjonctivite granuleuse, infection qui est transmise par contact.

Quelques années en arrière, il était généralement admis que Chlamydia pneumoniae était une sous-espèce de Chlamydia psittaci. L'existence de cette troisième espèce de Chlamydia a été déterminée en 1989. Des investigations plus récentes ont amené à la création d'un genre distinct, à savoir le genre Chlamydophila. En fonction de facteurs spécifiques à l'hôte, Chlamydophila pneumoniae peut provoquer des maladies aiguës au niveau des voies respiratoires supérieures, des bronches et des poumons. Les résultats des recherches laissent à penser que Chlamydophila pneumoniae joue un rôle dans l'asthme, les pneumopathies et d'autres troubles chroniques. Chlamydophila psittaci est un agent pathogène très répandu chez les oiseaux et les mammifères. On ne le trouve que rarement chez l'homme, chez qui il provoque des troubles respiratoires.

Pour diagnostiquer une infection par chlamydia, il est nécessaire de faire un test sur les tissus (frottis) ou une détermination des anticorps sériques. La détermination des anticorps est la méthode privilégiée lorsqu'il est difficile d'enrichir les antigènes ou lorsque les antigènes sont seulement présents dans des quantités indétectables. En utilisant des antigènes LPS (lipopolysaccharide) spécifiques à Chlamydia, les anticorps dirigés contre les trois espèces sont détectés en même temps.

3. Principe du test

Une microplaque est revêtue de LPS purifiés. Les anticorps présents dans les échantillons du patient se lient aux antigènes et sont détectés pendant la deuxième phase d'incubation à l'aide d'anti-anticorps humains marqués par une enzyme (le conjugué). Le substrat incolore (H₂O₂/TMB) est transformé par l'enzyme en un produit final de couleur bleue. La réaction de l'enzyme est arrêtée en ajoutant de l'acide sulfurique et la couleur du mélange passe

simultanément du bleu au jaune. La mesure finale est relevée sur un photomètre à 450 nm avec une longueur d'onde de référence de 620 nm.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Réactifs fournis (les réactifs fournis dans le kit permettent de faire 96 déterminations)

			KGM3101 IgG/IgM
Plate	96 dét.	Microplaque, 12 barrettes à micropuits (sécables) sur le support ; revêtue de l'antigène LPS de Chlamydia	X
Diluent	25 ml	Tampon de dilution d'échantillon, prêt à l'emploi ; tamponné au phosphate, bleu ; contient les stabilisateurs de protéines, Neolone et Bronidox	X
Wash	50 ml	Tampon de lavage (concentré 20 x) ; tampon phosphaté, contenant du Tween 20 et du ProClin	X
Control IgG +	500 µl	Contrôle positif IgG, sérum humain ; contenant du Neolone et du Bronidox	X
Control IgM +	500 µl	Contrôle positif IgM, sérum humain ; contenant du Neolone et du Bronidox	X
Control IgG -	500 µl	Contrôle négatif IgG, sérum humain ; contenant du Neolone et du Bronidox	X
Control IgM -	500 µl	Contrôle négatif IgM, sérum humain ; contenant du Neolone et du Bronidox	X
Cut off IgG	500 µl	Contrôle de valeur seuil IgG, sérum humain ; contenant du Neolone et du Bronidox	X
Cut off IgM	500 µl	Contrôle de valeur seuil IgM, sérum humain ; contenant du Neolone et du Bronidox	X
Conjugate IgG	15 ml	Conjugué anti-IgG humaine, prêt à l'emploi ; anticorps conjugués à de la peroxydase dans une solution tampon orange, contenant du Neolone et du Bronidox	X
Conjugate IgM	15 ml	Conjugué anti-IgM humaine, prêt à l'emploi ; anticorps conjugués à de la peroxydase dans une solution tampon orange, contenant du Neolone et du Bronidox	X
Substrat	15 ml	Substrat ; H ₂ O ₂ /tétraméthylbenzidine ; prêt à l'emploi	X
Stop	15 ml	Réactif d'arrêt Acide sulfurique 0,5 M ; prêt à l'emploi	X

5. Instructions de conservation des réactifs

- La trousse de test doit être conservée entre 2 et 8 °C et peut être utilisée jusqu'à la

date de péremption imprimée sur l'étiquette.

- Le tampon de lavage dilué peut être utilisé pendant 4 semaines maximum lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C.
- En ce qui concerne tous les autres réactifs, la date de péremption indiquée sur l'emballage est valable si le produit est conservé entre 2 et 8 °C.
- Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Le sachet en aluminium contenant la microplaque doit être ouvert sans arracher le joint d'étanchéité. Les barrettes à micropuits qui ne sont pas nécessaires doivent être remises immédiatement dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C.

Les réactifs ne doivent pas être contaminés et le substrat incolore doit être protégé de toute exposition directe à la lumière.

6. Réactifs requis, mais non fournis

6.1. Réactifs

- Eau distillée ou désionisée
- **Vircell ELISA SORBENT (Ref. Vircell S001)** (voir section 9.3)

6.2. Accessoires

- Incubateur ou chambre humide à 37 °C
- Tubes à essai
- Agitateur-mélangeur vortex
- Micropipettes d'une capacité de 10 à 100 µl et 100 à 1 000 µl
- Éprouvette graduée (1000 ml)
- Chronomètre
- Laveur de microplaque ou pipette multicanaux
- Lecteur de microplaque (450 nm, longueur d'onde de référence de 620 nm)
- Papier filtre (serviettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets contenant une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %

7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux et les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.

Les échantillons ou réactifs ne doivent pas être pipetés à la bouche et il convient d'éviter tout contact avec une peau ou des membranes muqueuses lésées. Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons et se laver les mains une fois le test terminé. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs de test sont utilisés.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

Les sérums de contrôle de la trousse (contrôle positif, contrôle négatif et contrôle de valeur seuil) ont été testés négatifs pour les anticorps du VIH et du VHC, ainsi que pour l'antigène HBs. Cependant, ils doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux et manipulés conformément aux règlements nationaux applicables en matière de sécurité, tout comme les échantillons de patients et tous les matériaux avec lesquels ils sont entrés en contact.

Le peroxyde d'hydrogène (substrat) peut provoquer des brûlures. Le manipuler avec prudence. Si la peau est contaminée par le réactif d'arrêt, la rincer à l'eau.

Le réactif d'arrêt contient de l'acide sulfurique 0,5 M. Éviter tout contact avec la peau et les vêtements. Si la peau est contaminée par le réactif d'arrêt, la rincer à l'eau.

Tous les réactifs et matériaux entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants adaptés ou passés en autoclave à 121 °C pendant au moins 1 heure.

Remarque: Pour éviter la formation de gaz toxiques, tout déchet liquide contenant du réactif d'arrêt doit être neutralisé avant de l'ajouter à la solution d'hypochlorite.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Le test a été développé dans le but de tester des échantillons de sérum humain. Après prélèvement, le sang doit être séparé des caillots dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les échantillons doivent être conservés dans un endroit frais ou congelés jusqu'à ce qu'ils soient soumis à un test. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois et éviter absolument toute contamination microbienne. L'utilisation d'échantillons inactivés par la chaleur, lipémiques, hémolytiques, ictériques ou troubles risque de donner lieu à des résultats erronés.

Tableau 2 : Conservation des échantillons

Sérum ou plasma non dilué	
2 à 8 °C	-20 °C
1 semaine	> 1 semaine

9. Réalisation du test

9.1 Informations générales

Tous les réactifs et la microplaque doivent être ramenés à température ambiante (20 - 25 °C) avant utilisation. Les barrettes à micropuits ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, la trousse doit immédiatement être conservée entre 2 et 8 °C.

Prélever uniquement le volume de réactifs nécessaire à la procédure de test. Ne pas remettre les réactifs dans les flacons au risque d'entraîner une contamination. Les barrettes à micropuits ne doivent être utilisées qu'une seule fois. Les réactifs et les barrettes à micropuits ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient.

Le tampon de dilution de l'échantillon, le tampon de lavage, le substrat et le réactif d'arrêt ne sont pas spécifiques au test ; ils peuvent aussi être utilisés avec d'autres tests RIDASCREEN® ELISA afin de déterminer les anticorps dirigés contre Chlamydia.

9.2 Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage **Wash** avec 19 volumes d'eau distillée. Pour ce faire, mettre 50 ml de concentré dans une éprouvette graduée de 1 000 ml et compléter la solution jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau distillée. Les cristaux présents dans le concentré doivent être préalablement dissous à chaud dans un bain-marie à 37 °C. Le tampon de lavage dilué peut être utilisé pendant 4 semaines maximum à condition d'être conservé entre 2 et 8 °C.

9.3 Préparation de l'échantillon

Avant de commencer le test, diluer les échantillons de sérum et les contrôles avec le tampon de dilution de l'échantillon **Diluent** à 1:21. Effectuer la dilution directement sur la microplaque. Le contrôle de valeur seuil doit être effectué en double. Il est nécessaire d'utiliser les contrôles qui correspondent à la détermination (IgG ou IgM).

- A1 Contrôle négatif
- B1 Contrôle de valeur seuil
- C1 Contrôle de valeur seuil
- D1 Contrôle positif
- E1, F1 Échantillon du patient 1, 2, etc.

Après avoir placé le nombre de puits requis pour les contrôles et les échantillons dans le support, pipeter 100 µl de tampon de dilution de l'échantillon dans chacun des puits de la plaque pour la détermination d'IgG, puis ajouter 5 µl d'échantillon ou de contrôle. Il faut faire vibrer brièvement la plaque pour effectuer le mélange :

IgG :
échantillon et contrôles -> 100 µl de **Diluent** + 5 µl d'échantillon ou de contrôle

Pour les déterminations d'IgM, les échantillons de la plaque doivent être soumis à une absorption IgG (par ex., avec Vircell ELISA SORBENT (Ref. Vircell S001)) et seulement alors être ajustés à la dilution prévue pour le test avec le tampon de dilution de l'échantillon. Lors de l'utilisation de **Vircell ELISA SORBENT**, procéder de la manière suivante :

IgM :
contrôles -> 100 µl de **Diluent** + 5 µl de contrôle
échantillon -> 25 µl de **Vircell ELISA SORBENT** + 5 µl d'échantillon + 75 µl de **Diluent**

Remarque: les contrôles ne doivent pas être absorbés

9.4 Première incubation

Incuber la plaque dans un incubateur ou une chambre humide à 37 °C pendant 45 minutes. Pendant ce processus, le fond des puits ne doit pas entrer en contact avec des matériaux thermoconducteurs (comme du métal ou du papier humide). La microplaque doit être recouverte pendant l'incubation.

Remarque : la microplaque ne doit pas être placée dans un récipient d'incubation froid amené à 37 °C pendant l'incubation. La température du récipient doit être préalablement amenée à 37 °C.

9.5. Lavage

Les puits doivent être vidés dans un conteneur de déchets contenant une solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Retourner ensuite la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Puis laver la plaque 5 fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant après chaque lavage sur un morceau de papier absorbant inutilisé.

Lorsqu'un laveur de microplaques est utilisé, s'assurer qu'il est correctement réglé par rapport au type de plaque utilisé. Après le lavage, retourner la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle.

9.6 Deuxième incubation

Ajouter 100 µl du conjugué **Conjugate IgG** ou **Conjugate IgM** dans chacun des puits correspondants. Ensuite, recouvrir la plaque et l'incuber à 37 °C pendant 30 minutes (voir section 9.4).

9.7. Lavage

Laver 5 fois conformément à la section 9.5.

9.8 Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat **Substrate** dans chaque puits. Ensuite, recouvrir la plaque et l'incuber à température ambiante pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière. Puis arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de réactif d'arrêt **Stop** dans chaque puits. Après un mélange soigneux (en tapotant légèrement le côté de la plaque), mesurer l'absorbance à 450 nm (longueur d'onde de référence 620 nm) avec un photomètre pour plaques. Étalonner le zéro par rapport à l'air. La mesure doit être effectuée dans l'heure qui suit l'ajout du réactif d'arrêt.

Remarque: si on utilise une chambre humide, avant d'effectuer la mesure, il faut essuyer le dessous de la microplaque pour éliminer toute condensation d'eau.

10. Contrôle qualité - signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

À des fins de contrôle qualité, les contrôles positifs, négatifs et de valeur seuil doivent être effectués à chaque exécution du test. Le contrôle de valeur seuil est effectué en double et la valeur moyenne est calculée à partir des deux mesures. Le test a été correctement exécuté lorsque les valeurs d'extinction (DO) répondent aux critères suivants :

Tableau 3 : Critères de contrôle qualité

	DO
Contrôle négatif	< 0,5
Contrôle de valeur seuil	> 0,55 < 1,5
Contrôle positif	> 0,9

Si les valeurs diffèrent des valeurs requises, si le réactif est trouble ou le substrat a viré au bleu avant d'être ajouté dans les puits, cela peut indiquer que les réactifs sont périmés. En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé (p. ex. étalonnage)
- Réalisation du test correcte
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; toute solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après le renouvellement du test, contacter un distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

11.1 Calcul de la valeur seuil de l'échantillon

1. L'absorbance moyenne est calculée pour le contrôle de valeur seuil.
2. La valeur seuil de l'échantillon est obtenue en divisant l'absorbance de l'échantillon par la valeur moyenne calculée.

Par exemple : Contrôle de valeur seuil 1 DO = 0,821
Contrôle de valeur seuil 2 DO = 0,865
Valeur moyenne = 0,843
DO échantillons DO = 1,508

$$\text{Échantillon valeur seuil} = \frac{1,508}{0,843} = 1,789$$

11.2 Interprétation des résultats

Tableau 4 : Analyse de la valeur seuil de l'échantillon

	Négatif	Équivoque	Positif
Valeur seuil de l'échantillon	< 0,9	0,9 à 1,1	> 1,1

12. Limites de la méthode

RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM ELISA détecte les anticorps IgG ou IgM dirigés contre les trois espèces de Chlamydia pathogènes pour l'homme. Le test ne peut pas servir à établir une relation entre l'extinction déterminée et la survenue de graves symptômes cliniques. Le test ne permet pas de déterminer la localisation de l'infection. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés conjointement au tableau clinique et aux autres résultats diagnostiques (par ex., l'isolation de l'agent pathogène).

Un résultat négatif n'exclut pas une infection, étant donné que l'échantillonnage est peut-être intervenu avant que les anticorps ne soient décelables. Dans ce cas, lorsqu'une infection est suspectée pour des raisons cliniques, le test doit être de nouveau effectué sur un deuxième échantillon de sérum prélevé deux ou trois semaines après.

Il faut toujours prélever deux échantillons consécutifs sur le patient et les soumettre à des tests sérologiques en parallèle pour améliorer la qualité du diagnostic. L'évolution du titre est essentielle à l'interprétation des résultats.

Des résultats IgG positifs chez les nouveau-nés doivent être interprétés avec précaution, étant donné qu'ils sont peut-être le résultat d'anticorps de la mère. Chez les enfants de moins de six mois, il est plus utile de détecter les anticorps IgM.

Les titres d'IgG très élevés peuvent mener à des résultats faux négatifs lors des déterminations d'IgM. De plus, les déterminations d'IgM peuvent mener à des résultats faux positifs du fait de facteurs rhumatoïdes. Il est possible de prévenir cela en absorbant le sérum avant d'effectuer le test (voir section 9.3).

Les réactions croisées avec des anticorps contre *Chlamydomydia psittaci* n'ont pas été étudiées du fait de la faible prévalence de cette maladie et de l'absence d'échantillons positifs lors de l'utilisation du test disponible.

La réponse immunitaire est faible lorsque les yeux sont infectés par *C. trachomatis*. L'adaptation du test pour le contrôle thérapeutique n'a pas été validée. La pertinence du test pour les maladies chroniques chez les enfants, les patients atteints de lymphogranulomatose vénérienne et les inflammations chroniques du bassin n'a pas été étudiée.

Un résultat positif n'exclut pas la présence d'un autre pathogène infectieux à l'origine de la maladie.

13. Performances

Tableau 5 : Variation inter-essais (n = 10)

Variation inter-essais	IgG	IgM
	CV	CV
Contrôle positif	3,22 %	2,62 %
Contrôle négatif	10,99 %	9,24 %
Contrôle de valeur seuil	5,00 %	7,36 %

Tableau 6 : Variation intra-essai (n = 10)

Variation intra-essai	IgG	IgM
	CV	CV
Contrôle positif	1,83 %	2,16 %
Contrôle négatif	6,98 %	8,00 %
Contrôle de valeur seuil	6,55 %	7,79 %

Tableau 7 : Sensibilité et spécificité comparées à celles du test par micro-immunofluorescence (MIF)

	IgG	IgM
Nombre d'échantillons	101	62
Sensibilité	96 %	92 %
Spécificité	98 %	100 %










Le test IgG a été aussi effectué sur 11 échantillons de patients infectés par *Rickettsia conorii* ou d'autres agents pathogènes provoquant des tableaux cliniques similaires à ceux de Chlamydia (VHS-2, *L. pneumophila*, *C. burnetii* et *M. pneumoniae*). Sept échantillons similaires ont été examinés avec le test IgM, de même que deux sérums positifs pour le facteur rhumatoïde. Aucune réaction croisée ou influence sur les résultats ELISA n'a été observée dans les sérums testés.

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et nom
2015-11-01	Version de la publication
2018-08-15	Révision générale
2018-09-20	Adaptation du symbole CE (n° d'identification de l'organisme notifié)
2019-12-16	Révision 6.1. Réactifs Révision 9.3. Préparation de l'échantillon

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de conservation
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Plate	Plaque de microtitrage
Diluent	Tampon de dilution d'échantillon
Wash	Tampon de lavage 20x
Control IgG +	Contrôle positif IgG
Control IgM +	Contrôle positif IgM
Control IgG -	Contrôle négatif IgG
Control IgM -	Contrôle négatif IgM
Cut off IgG	Contrôle de valeur de seuil IgG
Cut off IgM	Contrôle de valeur de seuil IgM
Conjugate IgG	Conjugate IgG
Conjugate IgM	Conjugate IgM
Substrat	Substrat
Stop	Réactif stop

16. Bibliographie

1. Finn, M. P., A. Ohlin et J. Schachter. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G and M antibodies to *Chlamydia trachomatis* in human sera. J Clin Microbiol 17:848-52.
2. Gonen, R., Y. Shemer-Avni, P. A. Csango, B. Sarov et M. G. Friedman. 1993. Serum reactivity to *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae* antigens in patients with documented infection and in healthy children by microimmunofluorescence and immunoblotting techniques. APMIS 101:719-26.
3. Gutierrez, J., J. Mendoza, F. Fernandez, J. Linares-Palomino, M. J. Soto et M. C. Maroto. 2002. ELISA test to detect *Chlamydia pneumoniae* IgG. J Basic Microbiol 42:13-8.
4. Jauhihainen, T., T. Tuomi, M. Leinonen, J. D. Kark et P. Saikku. 1994. Interference of immunoglobulin G (IgG) antibodies in IgA antibody determinations of *Chlamydia pneumoniae* by microimmunofluorescence test. J Clin Microbiol 32:839-40.
5. Jones, R. B., S. C. Bruins et W. J. Newhall 5^e. 1983. Comparison of reticulate and elementary body antigens in detection of antibodies against *Chlamydia trachomatis* by an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 17:466-71.
6. Ladany, S., C. M. Black, C. E. Farshy, J. M. Ossewaarde et R. C. Barnes. 1989. Enzyme immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). J Clin Microbiol 27:2778-83.
7. Mahony, J. B., J. Schachter et M. A. Chernesky. 1983. Detection of antichlamydial immunoglobulin G and M antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 18:270-5.
8. Numazaki, K., T. Ikebe et S. Chiba. 1996. Detection of serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* by ELISA. FEMS Immunol Med Microbiol 14:179-83.
9. Ossewaarde, J. M., A. de Vries, J. A. van den Hoek et A. M. van Loon. 1994. Enzyme immunoassay with enhanced specificity for detection of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 32:1419-26.