

IPAZyme™ Chlamydia IgG/IgA

CE 0483

**Détection indirecte, par
l'immunoperoxydase,
des anticorps IgG et IgA
spécifiques de Chlamydia
dans le sérum humain.**

Trousse permettant de réaliser 144 tests
Référence No. SAV 2992

conserver à 2° - 8°c
Ne pas congeler
Pour le diagnostic IN - VITRO

Généralites

Indication

Le test Chlamydia Ipazyme permet de détecter et de titrer dans le sérum humain les anticorps IgG et IgA spécifiques de Chlamydia.

Le test est réalisé *in vitro*, dans un but diagnostique.

Introduction

Chlamydia est une bactérie parasite dont le génome a une masse de 660×10^6 daltons (1-5). On distingue, dans le genre Chlamydia, trois espèces: *Chlamydia trachomatis* (CT) et *Chlamydia psittaci*, et plus récemment les souches TWAR. Toutes les Chlamydia ont en commun un antigène spécifique du genre, qui est un glycolipide (6). Les souches de CT ont en commun, à des degrés divers, des antigènes spécifiques de l'espèce et du type. Quatre sérovars sur 15 (A, B, Ba et C) provoquent le trachome endémique, responsable de millions de cas de cécité dans les pays en voie de développement; 8 sérovars (D à K) sont responsables de chlamydioses sexuellement transmises; trois sérovars (L₁, L₂ and L₃) sont responsables du lymphogranulome vénérien (LGV) (7). Il est bien établi aujourd'hui que les sérovars D à K de CT sont la cause majeure d'infections sexuellement transmises, telles que des urétrites non gonococciques (UNG), des urétrites post-gonococciques (UPG), des épидидymites, des cervicites, des endométrites, des salpingites, des périhépatites, des péritonites, des syndromes de Fiessinger-Leroy-Reiter, des conjonctivites et des pneumopathies (voir la revue générale de Sweet et coll., 10). Des études conduites en Europe, aux Etats-Unis et en Israël ont démontré que CT était une cause majeure de salpingite. Des études fondées sur des techniques de culture et/ou sur des méthodes sérologiques ont démontré que respectivement 58% et 23% des salpingites aiguës observées en Suède et aux Etats-Unis

allaient de pair avec une infection génitale concomitante à Chlamydia (11, 13). Il existe une corrélation entre les titres d'anticorps anti-Chlamydia et la sévérité de l'inflammation tubaire (évaluée par laparoscopie) d'une part, et l'ancienneté des douleurs pelviennes par rapport à la consultation médicale, d'autre part (11, 14). De plus, un à deux tiers des cas de stérilité tubaire sont imputables à une infection antérieure à CT (généralement infra-clinique). Les méthodes utilisées pour le diagnostic des infections à Chlamydia sont l'isolement en culture cellulaire, la détection directe des Chlamydiae sur lame par immunofluorescence, le dosage par la méthode E.L.I.S.A. (enzyme linked immunosorbent assay) et/ou les méthodes sérologiques de détection des anticorps anti-CT, telles que le test de fixation du complément (FC), le test en microimmunofluorescence (MIF), le dosage immuno-enzymatique (EIA) ou le dosage radio-immunologique (RIA) (voir revues d'Evans et Woodland, 15, ainsi que de Treharne et coll., 16). L'isolement de CT par un test diagnostique standard offre l'inconvénient de ne pouvoir être réalisé dans toutes les infections à CT. C'est ainsi par exemple qu'en cas de salpingite et de stérilité d'origine mécanique secondaire à une infection à CT, on ne peut habituellement pas isoler le germe dans le liquide de rinçage tubaire. Dans certains cas, on peut identifier CT à la biopsie (14, 30). D'après plusieurs études récentes (11, 14, 17-23), il serait possible de détecter précocément une infection à CT en évolution par la mise en évidence de titres élevés d'anticorps IgG et IgA spécifiques de Chlamydia. On a enregistré des titres particulièrement élevés d'anticorps IgG anti-CT dans des cas d'infection chronique ou systémique, comme des salpingites, stérilités d'origine mécanique, périhépatites (syndrome de Curtis-Fitz-Hugh) et pneumopathies à Chlamydia (11-14, 17-21, 24 25, 33). Il a été démontré qu'il existait significativement plus souvent des anticorps IgA anti-CT en cas d'urétrite non gonococcique (avec présence

identifiée de CT), chez les femmes souffrant de salpingite aiguë ou de stérilité d'origine mécanique que chez des témoins appariés (21, 26-28). L'existence de marqueurs sérologiques des infections à CT constitue une aide précieuse, susceptible d'éviter le recours à des examens invasifs, dans un but diagnostique. Les infections génitales dues à CT sont souvent asymptomatiques et leur dépistage précoce, est d'un intérêt considérable, puisqu'il existe des traitements efficaces (par exemple les tétracyclines ou l'érythromycine) permettant d'empêcher CT d'atteindre le tractus génital supérieur ou d'y provoquer des lésions. Il n'est pas impossible qu'un dépistage systématique dans toute la population s'avère économique, en réduisant le coût du traitement de la stérilité. Le dosage des anticorps IgG et IgA anti-CT permet de suivre de façon satisfaisante l'efficacité du traitement, chez les malades souffrant d'infections à CT.

Savyon Diagnostics Ltd. propose une méthode indirecte à l'immunoperoxydase, avec pour antigène des cellules infectées par le sérotype L₂ de CT. Ce test permet de détecter les anticorps IgG et IgA spécifiques de CT. Il a été établi que le sérotype L₂ présentait un antigène à large éventail de réactivité, et réagissait avec 95,5% des sérums humains dans lesquels l'immunofluorescence indirecte à un seul antigène révèle la présence d'anticorps anti-CT (8). Ce test peut être réalisé dans la grande majorité des laboratoires, car il est économique et simple.

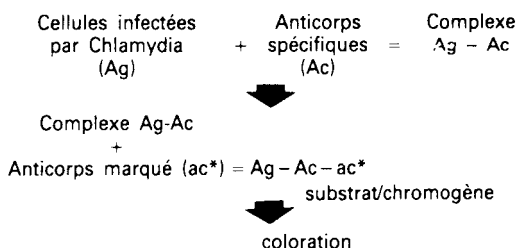
Principe de détection par l'immunoperoxydase

Cette réaction comporte les étapes suivantes: dans la première étape, on met en contact le sérum du malade avec le matériel antigénique (cellules infectées par *Chlamydia trachomatis*). Si le sérum contient des anticorps, ceux-ci se fixent à l'antigène, formant ainsi un complexe antigène-anticorps.

Si au contraire le sérum examiné ne contient pas d'anticorps dirigés contre cet antigène particulier, il ne se forme pas de complexe et

toutes les composantes du sérum sont éliminées lors de la phase de rinçage.

La seconde étape du test consiste à ajouter au milieu un conjugué de peroxydase du raifort (PR) et d'IgG anti-humaine (spécifique de la chaîne gamma) ou d'IgA anti-humaine (spécifique de la chaîne alpha). S'il s'est formé un complexe antigène-anticorps lors de la première étape, l'anticorps marqué par la peroxydase se fixe à l'anticorps du complexe dans la seconde étape. Une réaction positive, c'est-à-dire un précipité bleu à bleu foncé dans les cellules infectées, peut être observée à l'aide d'un microscope optique ordinaire, après la réaction enzymatique de la fraction peroxydase avec le peroxyde d'hydrogène et un chromogène approprié.



Contenu du kit

1. 12 lames avec 12 puits, portant des cellules infectées par *Chlamydia trachomatis*.
2. 1 flacon de 0,5 ml contenant un témoin IgA positif (sérum humain contenant des anticorps IgA anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi.
3. 1 flacon de 0,5 ml contenant un témoin IgG positif (sérum humain contenant des anticorps IgG anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi.
4. 1 flacon de 0,5 ml contenant un témoin négatif (sérum humain ne contenant aucun anticorps IgA, IgG et IgM anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi.

5. 1 flacon de 1 ml contenant des anti-IgA humaines (IgA de lapin, spécifiques de la chaîne alpha) marquées par la peroxydase du raifort. Prêt à l'emploi.
6. 1 flacon de 1,5 ml contenant des anti-IgG humaines (IgG de lapin, spécifiques de la chaîne gamma) marquées par la peroxydase du raifort. Prêt à l'emploi.
7. 1 flacon de 2 ml contenant un substrat/ chromogène (Brevet en attente). Prêt à l'emploi.
8. 1 flacon de 4 ml de milieu de montage des préparations. Prêt à l'emploi.
9. 1 flacon de 100 ml contenant le tampon lpazyme Chlamydia concentré ($\times 20$).
10. 15 lamelles.
11. Un bulletin de contrôle.
12. Une notice d'emploi.

Stockage et date limite de conservation des réactifs

Tous les éléments fournis dans le kit, à l'exception des lamelles couvre-lame, doivent être stockés *entre 2°C et 8°C*. Toutefois, l'exposition à la température ambiante pendant quelques heures n'induit aucune altération des réactifs. *Ne jamais congeler*. Si le kit est conservé en permanence à une température comprise entre 2°C et 8°C, les réactifs contenus dans leur conditionnement d'origine, laissé intact, restent stables pendant les durées indiquées sur chaque étiquette. Les réactifs d'un même lot se conservent jusqu'à la date figurant sur l'emballage. Une fois le kit ouvert, les éléments se conservent 60 jours après la date de première utilisation. Passé ce délai, il faut jeter tous les réactifs du lot.

Précautions d'emploi

1. Le matériel antigénique est fixé et ne contient pas d'organismes vivants décelables. Toutefois, il faut manipuler et utiliser les lames comme on le ferait avec tout matériel biologique potentiellement dangereux.

2. Tous les échantillons de sérum humain ont fait l'objet d'un test radio-immunologique démontrant l'absence d'antigène de surface HBs de l'hépatite B et d'anticorps anti-HIV. Toutefois, cela ne garantit pas formellement l'absence de l'antigène de l'hépatite ou celui de SIDA.
3. Les composantes de ce kit ont été testées par lot. Ne jamais mélanger les composantes de différents lots ni mélanger à des kits d'autres fabricants.
4. Ne jamais utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée, quand les conditionnements originaux sont toujours intacts. Le délai de conservation de toutes les composantes du kit (à l'exclusion du milieu de montage, et des lamelles couvre-lame) est limité à 60 jours après l'ouverture du conditionnement.
5. Réservé au diagnostic *IN VITRO*.

Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

1. Tubes à essai et portoirs pour préparer les dilutions de sérum du malade et/ou de sérum témoin.
2. Micropipettes (10, 20, 60 et 300 microlitres) et systèmes de sécurité afférents.
3. Un bain-marie à 37°C muni d'un couvercle ou une chambre humide placée dans une étuve à 37°C.
4. Tablette porte-lames.
5. Microscope optique d'un *grossissement de 10×20, muni d'un filtre bleu*.
6. Erlenmeyer de 2,0 litres de contenance pour diluer le Tampon Ipazyme concentré.
7. Flacon de rinçage.
8. Eau distillée, pour diluer le Tampon Ipazyme concentré.

Recueil de l'échantillon

Recueillir les échantillons de sérum en respectant l'asepsie et les conserver entre 2°C et 8°C en présence d'un conservateur (azoture de sodium à 0,2%, (NaN₃)), si le dosage doit avoir lieu dans les jours suivants. Si le dosage est

prévu pour plus tard, conserver les prélèvements à -20°C. Bien que l'on ignore les incidences de l'hémolyse et/ou de la turbidité sur le dosage, il est vivement recommandé de réaliser le dosage sur des échantillons sériques limpides, sans hémolyse.

Réalisation du Test

Remarques

- 1 Le test doit être effectué par une personne rompue aux techniques de laboratoire.
2. Tous les réactifs doivent être à température ambiante avant l'utilisation.
- 3 Chaque fois que l'on pratique un test, il faut tester également le témoin positif et le témoin négatif (une lame suffit).
4. Le bulletin indiquant les résultats obtenus avec des sérums témoins permet au biologiste de contrôler lui-même la validité du test.
5. Utiliser du matériel à usage unique. Eviter toute contamination croisée entre les réactifs.

Mode d'emploi:

1 Retirer le nombre voulu de lames de leurs sachets et les placer dans le porte-lames.

2 Préparer les dilutions suivantes de chaque sérum de malade avec le Tampon Ipazyme, fourni, préalablement dilué comme indiqué sur l'étiquette du flacon.

l: 16 (20 microlitres de sérum du malade + 300 microlitres de Tampon)

l: 64 (20 microlitres du sérum dilué au 1:16 + 60 microlitres de Tampon)

l:128 (20 microlitres de sérum dilué au 1: 64 + 20 microlitres de Tampon)

Utiliser – la dilution 1/16 pour le dosage des IgA
– les dilutions 1/64 et 1/128 pour le dosage des IgG

3 Pipetter dans chaque puits 10 microlitres d'un sérum témoin ou d'une dilution du sérum du malade.

4 Placer les lames dans une chambre humide ou dans un bain-marie muni d'un couvercle* et incuber à 37°C pendant 45 minutes.

5 Rincer soigneusement les lames, soit avec un jet de tampon contenu dans une pissette, soit dans un récipient rempli de tampon, en imprimant aux lames des mouvements de haut en bas.

6 Sécher les lames à l'air comprimé ou à l'aide d'un séchoir type séchoir à cheveux.

7 Pipetter dans chaque puits 10 microlitres de conjugué de peroxydase de raifort. Placer les lames dans une chambre humide fermée par un couvercle ou au bain-marie, et incuber à 37°C pendant 45 minutes.

8 Renouveler les opérations 5 et 6.

9 Pipetter 10 microlitres de solution de chromogène/substrat dans chaque puits. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.

10 Renouveler les opérations 5 et 6.

11 Verser quatre petites gouttes de milieu de montage sur chaque lame et couvrir d'une lamelle. Eviter d'enfermer des bulles d'air entre la lame et la lamelle.

12 Procéder à la lecture le jour même, au microscope optique, à un *grossissement de 10×20*. Il est recommandé d'utiliser un filtre bleu pour lire les résultats.

* Il importe de veiller à bien fermer la chambre humide ou le bain-marie, faute de quoi les réactifs pipetés se dessèchent pendant l'incubation. Eviter que des gouttes de vapeur d'eau ne tombent du couvercle sur les lames.

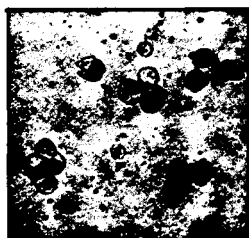
Remarques

1. Il est recommandé de déterminer le résultat définitif à un *grossissement de 10×20* ou à un grossissement voisin, car on *risque des erreurs d'interprétation aux autres grossissements.*
2. Si le milieu de montage se répand sur le microscope, il est conseillé de nettoyer immédiatement avec un linge humide.

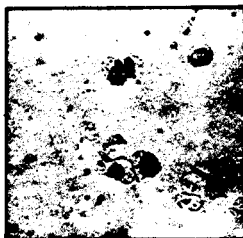
Obtention des Résultats

La population cellulaire présente sur les lames est non composée de cellules infectées et de cellules non-infectées.

La présence d'un précipité bleu dans les cellules infectées est le signe d'une réaction positive, et l'absence de précipité bleu dans les cellules infectées est le signe d'une réaction négative à ce test. Dans de cellules non infectées, il ne doit pas apparaître de précipité bleu. Toute coloration bleue dans les cellules infectées, par comparaison aux cellules non infectées, doit être considérée comme signant une réaction positive.



POSITIF (+)



POSITIF (+)



LIMITE (±)



NEGATIF (-)

Grossissement 10×20

Interprétation Suggérée des Résultats

Dosage	Dilution	Résultats possibles							
		1	2	3	4	5	6	7	8
IgG	1:64	+	+	+	+	+	+	-	-
IgG	1:128	+	-	+	-	±	-	-	-
IgA	1:16	+	+	-	±	-	-	+	-

Résultat	Interprétation possible
1	Infection active
2	Infection active
3	Infection active ou passée*
4	Résultat limite d'une infection active
5	Réaction positive
6	Réaction positive
7	Eventualité rare: répéter le test
8	Réaction négative (ou légèrement positive, à une dilution inférieure à 1:64).

N.B. * Les IgG peuvent persister plus longtemps que les IgA – L'interprétation doit être faite à la lumière des symptômes cliniques et du passé du patient ayant eu une infection à Chlamydia.

Si les résultats sont de type 4, répéter le dosage de IgA à la dilution de 1/8. Les différentes éventualités sont alors les suivantes:

	IgA 1/8		IgA 1/16 (±)		Situation
Si	+	alors	+	Voir	2
Si	-	alors	-	Voir	6
Si	±	alors	-	Voir	6

Remarques

- A. Ces interprétations sont fondées sur une étude conduite sur des femmes hospitalisées pour une salpingite aiguë et sur des témoins. Il est recommandé de reconfirmer la validité de ces résultats obtenus sur un seul échantillon, en déterminant le titre normal d'anticorps dans la région géographique concernée et dans la population étudiée.
- B. Il est recommandé d'utiliser ce test en cas de salpingite aiguë. Toutefois, il est possible d'obtenir des résultats similaires en cas de stérilité d'origine mécanique, d'infection systémique à CT (pneumopathie, périhépatite) ou d'autres infections chroniques.
- C. Les infections muqueuses superficielles (telles que les urétrites non gonococciques) peuvent induire une réponse immunitaire différente.
- D. Pour les études séro-épidémiologiques ou les dépistages dans une population donnée, il est possible de prendre également en considération des titres d'anticorps IgG anti-CT de 1/16 ou 1/32 avec une valeur prédictive négative très élevée.

Limites du test

1 Si toutes les cellules, y compris les cellules non infectées, donnent une réaction positive, le résultat du test n'est pas valide. Avec le kit IPAZYME Chlamydia, ce phénomène est rare et lié au sérum. Il peut s'expliquer par un état pathologique autre qu'une infection à

Chlamydia ou associé à celle-ci, comme par exemple la présence d'anticorps antinucléaires ou d'anticorps antimitochondriaux, ou par une réaction non spécifique inexplicée (31, 32).

2 L'interprétation des résultats obtenus en cas de salpingite est fondée sur un nombre restreint de dilutions de sérum. Il est conseillé de pratiquer d'autres dilutions du sérum.

3 Ce test est un dosage par l'immunoperoxydase fondé sur un seul antigène (L₂). Celui-ci contient des déterminants antigéniques qui existent dans les 14 autres sérotypes de CT ainsi que dans l'antigène de groupe. Bien que les cellules utilisées dans ce test soient infectées par des CT de sérotype L₂, ce test à l'immunoperoxydase peut révéler des anticorps dirigés contre *Chlamydia psittaci* les souches TWAR et *Acinetobacter calcoaceticus*.

4 Si l'on réalise des dilutions successives, on peut avec le présent test titrer des anticorps IgG ou IgA. Toutefois, le diagnostic ne doit jamais exclusivement reposer sur un test sérologique unique. Il faut prendre en considération toutes les données cliniques, y compris le profil chimiothérapeutique quand les malades ont déjà reçu un traitement médicamenteux.

5 En cas d'hyperlipidémie, il peut se former un "film", dû à l'adhérence non spécifique des lipides au verre. Ce film se décolle difficilement. Cette réaction, rare, peut s'observer sur les bords des puits, à l'endroit où le sérum est en contact avec la lame. Comme cette réaction n'est pas spécifique, on doit la négliger. Seule la réaction observée au centre du puits doit être prise en compte dans l'interprétation du résultat.

Bibliographie

1. Sarov, I. and Becker, Y. (1968). RNA in Elementary Bodies of Trachoma Agent. *Nature* 217:849-852
2. Sarov, I. and Becker, Y. (1969). Trachoma Agent DNA. *J. Mol. Biol.* 42:581-589.
3. Hatch, T.P. Host-Free Activities of Chlamydia. In Mardh, P.A. et al. (Eds.) *Chlamydial Infections*, pp. 25-28. Elsevier Biomedical Press, 1982.
4. Weiss, E. (1965). Adenosine Triphosphate and Other Requirements for the Utilization of Glucose by Agents of the Psittacosis-Trachoma Group. *J. Bacteriol.* 90:243-253.
5. Moulder, J.W. (1984). Looking at Chlamydial Without Looking at Their Hosts. *ASM News* 50:353-362.
6. Kuo, C.C., Chen, H.H., Wang, S.P. and Grayston, J.T. (1986). Identification of a New Group of Chlamydia psittaci Strains Called TWAR. *J. Clin. Microbiol.* 24:1034-1037.
7. Marrie, T.J., Grayston, J.T., Wang, S.P. and Kuo, C.C. (1987). Pneumonia Associated with the TWAR Strain of Chlamydia. *Ann. Int. Med.* 106: 507-511.
8. Dhir, S.P., Hakomori, S., Kenny, G.E. and Grayston, J.T. (1972). Immunochemical Studies on Chlamydial Group Antigen (Presence of a 2-Keto-3-Deoxycarbohydrate as Immunodominant Group). *J. Immunol.* 109:116-122.
9. Wang, S.P., Grayston, J.T. Micro-Immunofluorescence Antibody Responses in Chlamydia trachomatis Infection, a Review. In Mardh, P.A. et al. (Eds.). *Chlamydial Infections*, pp. 301-316. Elsevier Biomedical Press, 1982.
10. Ladany, S. and Sarov, I. (1985). Recent Advances in Chlamydia trachomatis. *Eur. J. Epidemiol.* 1:235-256.

11. Gardner, P.S.:Rapid Virus Diagnosis. In Voller, A., Bartlett, A.B.A. and Bidwell, D. (Eds.). *Immunoassays for the 80s*, pp. 353-360. M.T.P. Press Limited, 1980.
12. Schachter, J. Human Chlamydia psittaci Infection. In Oriel, D., Ridgway, G., Schachter, J. and Ward, M. (Eds.). *Chlamydial Infections*, pp. 311-320. Cambridge University Press, 1986.
13. Schachter, J., Grossman, M. and Azimi, P.H. (1982). Serology of Chlamydia trachomatis in Infants. *J. Infect. Dis.* 146:530-535.
14. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984). Chlamydial Pneumonitis and its Serodiagnosis in Infants, *J. Infect. Dis.* 149:598-604.
15. Stutman, H.R., Rettig, P.J. and Reyes, S. (1984). Chlamydia trachomatis as a Cause of Pneumonitis and Pleural Effusion. *J. Pediat.* 104:588-591.
16. Paran, H., Heimer, D. and Sarov, I. (1986). Serological, Clinical and Radiological Findings in Adults with Bronchopulmonary Infections Caused by Chlamydia trachomatis. *Israel J. Med. Sci.* 22:823-827.
17. Sweet, R.L., Landers, D.V., Walker, C., Schachter, J. (1987). Chlamydia trachomatis Infection and Pregnancy Outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156:824-833.
18. Treharne, J.D., Ripa, K.T., Mardh, P.A., Svensson, L., Westorm, L. and Darougar, S. (1979). Antibodies to Chlamydia trachomatis in Acute Salpingitis. *Br. J. Vener. Dis.* 55:26-29.
19. Osser, S. and Persson, K. (1982). Epidemiologic and Serodiagnostic Aspects of Chlamydial Salpingitis. *Obstet. Gynecol.* 59:206-209.
20. Keat, A.C., Thomas, B.J., Taylor-Robinson, D., Pegrum, G.D., Maini, R.N. and Scott, J.T. (1980). Evidence of Chlamydia trachomatis Infection in Sexually Acquired Reactive Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 39:431-437.

Fabriqué par:



SAVYON DIAGNOSTICS Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610, Israel

Tel: 972.8.8562920 Fax: 972.8.8523176

e-mail: support@savyondiagnosics.com



Obelis s.a.

(European Authorized Representative Center)

Av. de Tervuren, 34 bte 44, B-1040 Brussels

Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03

e-mail: mail@obelis.net

Mobile: +32.475.45.46.60

Distribué par:

BMD s.a.

BP103

77423 Marne La Vallée cedex 2

Tel: (1) 64621012