

CHLAMYDIA TRACHOMATIS

ELISA IgG/IgM

Producto para diagnóstico *in vitro*

G/M1017: Prueba inmunoenzimática indirecta para determinar anticuerpos IgG y/o IgM frente a *Chlamydia trachomatis* en suero/plasma humano. 96 tests.

INTRODUCCIÓN:

C. trachomatis es el agente más frecuente en enfermedades de transmisión sexual de origen bacteriano. Causa uretritis en varones y cervicitis y salpingitis en mujeres. En recién nacidos de madres infectadas ocasiona conjuntivitis y neumonía. El diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* se realiza mediante cultivo celular o técnicas serológicas. La técnica serológica más común es la microinmunofluorescencia indirecta, pero las técnicas de ELISA son más fáciles de realizar. En la prueba se utiliza como antígeno COMP (Complexes of Outer Membrane Proteins) de *C. trachomatis*, eliminando el LPS responsable de la mayor parte de las reacciones cruzadas con otras especies de *Chlamydia*.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Método de ELISA basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados; la unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

CARACTERÍSTICAS:

Todos los reactivos a excepción de la solución de lavado vienen listos para su uso.

Las soluciones de dilución de muestras y de conjugado están coloreadas como ayuda a la realización de la técnica.

No se precisa dilución previa de la muestra.

Los pocillos son individuales, por lo que solo se consumen tantos pocillos como pruebas se van a realizar.

CONTENIDO DEL KIT:

1 VIRCELL CHLAMYDIA TRACHOMATIS PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con antígeno COMP (Complexes of Outer Membrane Proteins) de *C. trachomatis*, cepa 434 LGV tipo II (ATCC VR-902B).

2 VIRCELL SERUM DILUENT: 25 ml de diluyente para sueros: tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, con Neolone y Bronidox y coloreado de azul. Listo para su uso.

3G VIRCELL IgG POSITIVE CONTROL: 500 µl de suero control positivo para IgG con Neolone y Bronidox.

3M VIRCELL IgM POSITIVE CONTROL: 500 µl de suero control positivo para IgM con Neolone y Bronidox.

4G VIRCELL IgG CUT OFF CONTROL: 500 µl de suero cut off para IgG con Neolone y Bronidox.

4M VIRCELL IgM CUT OFF CONTROL: 500 µl de suero cut off para IgM con Neolone y Bronidox.

5G VIRCELL IgG NEGATIVE CONTROL: 500 µl de suero control negativo para IgG con Neolone y Bronidox.

5M VIRCELL IgM NEGATIVE CONTROL: 500 µl de suero control negativo para IgM con Neolone y Bronidox.

6G VIRCELL IgG CONJUGATE: 15 ml de una dilución de globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa, con Neolone y Bronidox y coloreada de naranja. Lista para su uso.

6M VIRCELL IgM CONJUGATE: 15 ml de una dilución de globulina anti-IgM humana conjugada con peroxidasa, con Neolone y Bronidox y coloreada de naranja. Lista para su uso.

7 VIRCELL TMB SUBSTRATE SOLUTION: 15 ml de solución de sustrato: tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.

8 VIRCELL STOP REAGENT: 15 ml de solución de parada: ácido sulfúrico 0,5 M.

9 VIRCELL WASH BUFFER: 50 ml de solución de lavado (concentrado 20x): tampón fosfatos con Tween^R-20 y con Proclin 300.

Conservar entre 2 y 8°C y comprobar la fecha de caducidad.

Material necesario no contenido en el kit:

- Pipeta de precisión para dispensar 5 y 100 µl.
- Pipeta multicanal de precisión para dispensar 100 µl.
- Lavador de placas de ELISA.
- Incubador/baño termostático.
- Espectrofotómetro de placas de ELISA con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm.
- Agua destilada.
- Alternativamente procesador automático de ELISA.
- Para las pruebas de IgM, sorbente de IgG humana (ref. Vircell S001).

CONSERVACIÓN:

Conservar entre 2 y 8°C. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La caducidad indicada será válida siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 8°C.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

Componente	Estabilidad
Solución de lavado diluida (1x)	4 meses a 2-8°C
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8°C

ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:

Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.

No permitir el secado de la placa entre los lavados y la adición de los reactivos.

La solución de sustrato es fotosensible. Evitar la exposición directa a la luz y desechar si presenta coloración azul. La solución de sustrato no debe entrar en contacto con oxidantes como soluciones de hipoclorito ni con algunos metales. Evitar el contacto con partes metálicas o componentes metálicos de equipos o instrumentos sin antes haber comprobado su compatibilidad.

Utilizar solo la cantidad de solución de lavado, sustrato, diluyente de sueros y conjugado necesarias para la realización de la prueba. No devolver a los viales el exceso sobrante.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.



RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:

1. Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
2. Usar solo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Solo las soluciones de lavado, sustrato, parada y diluyente de sueros son compatibles con los equivalentes en otras referencias y lotes de ELISA VIRCELL.
3. Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar solo material limpio y preferentemente desechable.
4. No utilizar en caso de deterioro del envase.
5. No pipetear con la boca.
6. El diluyente para sueros, placa, conjugados y controles de este equipo contienen material de origen animal. Los controles contienen además material de origen humano. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg y anticuerpos frente a VIH y Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos. Los pocillos contienen antígeno inactivado, no obstante, deben manejarse con precaución. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de éstos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.
7. Para la utilización del producto en sistemas automáticos de análisis se recomienda una evaluación previa. VIRCELL dispone de juegos de muestras para su ensayo en paralelo con el método manual. Estos juegos pueden ser solicitados con tal finalidad. Asimismo, es posible la consulta de un listado de sistemas automatizados aprobados para su utilización con la gama de productos ELISA VIRCELL.
8. Durante los períodos de incubación, un adecuado sellado de las placas con la lámina adhesiva que se suministra evita la desecación de la muestra y garantiza la repetitividad de los resultados.
9. Para determinación de anticuerpos IgM, este producto ha sido diseñado para su uso conjunto y exclusivo con SORBENTE de IgG humana VIRCELL (ref. Vircell S001).
10. Evitar el contacto de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M) con la piel o los ojos. En caso de contacto, lavar la zona inmediatamente con agua.
11. Proclin 300 está incluido como conservante en la solución de lavado. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. En caso de contacto con la piel lavar con agua y jabón abundantes. Para más información, solicite la hoja de información del producto.

TOMA DE MUESTRA:

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas asépticas o estériles para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros/plasmas deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20°C, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. No utilizar muestras hiperlipémicas, hemolizadas o contaminadas. Las muestras que presenten partículas pueden ser clarificadas por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

El único reactivo que es necesario preparar con antelación a la realización de la prueba es la solución de lavado. Para ello completar hasta 1 litro con agua destilada un vial de 50 ml de solución de lavado concentrada (20x). Si aparecen cristales durante la conservación de la solución concentrada, calentar a 37°C antes de diluirlo. Una vez preparada conservar entre 2 y 8°C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

1. Ajustar una estufa/baño de agua a 37±1°C.
2. Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando sacar la placa del envase.
3. Agitar todos los componentes.
4. Sacar el número de pocillos **1** necesarios para el número de muestras que se van a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero cut off. Colocar el resto de los pocillos en el sobre y volver a cerrarlo.
5. Para determinación de anticuerpos IgG añadir 100 µl de diluyente de muestras **2** a todos los pocillos que se vayan a emplear. Añadir 5 µl de las muestras, 5 µl del control positivo **3G**, 5 µl del suero cut off **4G** (en duplicado) y 5 µl del control negativo **5G** en los pocillos correspondientes. En el caso de la realización manual del método, se agitará la placa en un agitador (2 minutos) para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos. Si no es posible asegurar esta agitación, debe hacerse una predilución de la muestra en tubo o placa añadiendo el doble del volumen de diluyente de muestras **2** y de muestra. Homogenizar con la pipeta y trasvasar seguidamente 105 µl de cada muestra ya diluida a los pocillos **1**.
6. Para determinación de anticuerpos IgM añadir 25 µl de sorbente IgG (ref. Vircell S001) a todos los pocillos que se vayan a emplear, excepto a los pocillos donde se dispensen los controles. Añadir 5 µl de las muestras y seguidamente 75 µl de diluyente de muestras **2** a todos los pocillos empleados. Para la preparación de los pocillos de los controles, añadir 100 µl de diluyente de muestra **2**, y seguidamente 5 µl del control positivo **3M**, 5 µl del suero cut off **4M** (en duplicado), y 5 µl del control negativo **5M** en los pocillos correspondientes. En el caso de la realización manual del método, se agitará la placa en un agitador (2 minutos) para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos. Si no es posible asegurar esta agitación, debe hacerse una predilución de la muestra en tubo o placa añadiendo el doble del volumen de los reactivos y de muestra. Homogenizar con la pipeta y trasvasar seguidamente 105 µl de cada muestra ya diluida a los pocillos **1**.
7. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 45 minutos a 37±1°C.
8. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado **9**, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
9. Añadir inmediatamente 100 µl de conjugado IgG **6G** o IgM **6M** a todos los pocillos.
10. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 30 min. a 37±1°C.
11. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado **9**, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.



12. Añadir inmediatamente 100 µl de solución de sustrato **7** a todos los pocillos.
13. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.
14. Añadir inmediatamente 50 µl de solución de parada **8** a todos los pocillos.
15. Valorar espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles.

La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:

Cada ensayo debe utilizar control positivo, negativo y cut off. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo.

Las densidades ópticas (D.O.) de los controles deben estar en los rangos siguientes. En caso contrario se desechará la prueba.

Control	D.O.
Control positivo	>0,9
Control negativo	<0,5
Control cut off	>0,55
	<1,5

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Calcular la media de las D.O. del suero cut off.

Índice de anticuerpos=(D.O. de la muestra/media de D.O. del suero cut off) x 10

Índice	Interpretación
<9	Negativo
9-11	Dudoso
>11	Positivo

Las muestras con resultados dudosos deben ser vueltas a analizar y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 9 se considera que no tienen anticuerpos específicos frente a *C. trachomatis* IgG o IgM, según el procedimiento empleado.

Las muestras con índices superiores a 11 se considera que tienen anticuerpos específicos frente a *C. trachomatis* IgG o IgM, según el procedimiento empleado.

LIMITACIONES DEL MÉTODO:

1. Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
2. El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, lavados y tiempos de incubación.
3. Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos

diagnósticos. El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante técnicas de aislamiento.

4. El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.

5. La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.

6. Las muestras recogidas muy pronto en el transcurso de una infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En esos casos se recomienda realizar un ensayo para determinación de IgM u obtener una segunda muestra transcurridos entre 14 y 21 días para ser ensayado en paralelo con la muestra original con el fin de determinar una seroconversión.

7. Los resultados obtenidos en la detección de IgG en neonatos deben ser interpretados con precaución, ya que las IgG maternas son transferidas pasivamente de la madre al feto antes del nacimiento. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.

8. Los resultados de determinación de anticuerpos de una muestra única no deben ser usados para el diagnóstico de una infección reciente. Se deben recoger muestras pareadas (aguda y convaleciente) para ser ensayadas paralelamente y determinar seroconversión o un incremento significativo en el nivel de anticuerpos.

9. Para la determinación de IgM se debe realizar la técnica utilizando sorbente de anticuerpos IgG humanos ya que de otro modo se pueden obtener resultados falsos positivos por la presencia de factor reumatoide o resultados falsos negativos por exceso de anticuerpos IgG.

10. No se ha evaluado el grado de reacción cruzada de este ensayo con muestras positivas de *Chlamydomphila psittaci* debido a su baja prevalencia y la carencia de muestras.

11. No se ha evaluado la validez de este ensayo para el seguimiento del tratamiento.

12. Ensayos de ELISA a dilución única no presentan una relación lineal con títulos detectados por inmunofluorescencia.

13. La respuesta serológica en enfermedades con patología ocular por *C. trachomatis* es poco relevante.

14. No se ha evaluado el rendimiento de la prueba en enfermedades crónicas en niños.

15. No se ha evaluado el rendimiento de esta técnica en enfermos de linfogranuloma venereo y enfermedad pélvica inflamatoria.

16. Los resultados de prestaciones incluidos corresponden a estudios comparativos con equipos de referencia comerciales en una muestra poblacional definida. Pueden encontrarse pequeñas variaciones en poblaciones diferentes o con equipos de referencia distintos.

PRESTACIONES

• SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:

Se ensayaron 78 muestras de suero/plasma con CHLAMYDIA TRACHOMATIS ELISA IgG/IgM frente a un equipo de inmunofluorescencia para determinación IgG y 60 muestras frente a un equipo de inmunofluorescencia para determinación IgM, obteniendo los siguientes resultados:

	Nº muestras	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgG	78	96	100
95% C.I.		90-100	93-100
IgM	60	90	100
95% C.I.		60-98	93-100

C.I. Intervalo de confianza

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.



• **PRECISIÓN INTRAENSAYO:**

DETECCIÓN IgG

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente 10 veces cada uno en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	2,25
CN	10	7,50
CO	10	3,58

C.V. Coeficiente de variación

DETECCIÓN IgM

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente 10 veces cada uno en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	1,81
CN	10	6,63
CO	10	3,49

C.V. Coeficiente de variación

• **PRECISIÓN INTERENSAYO:**

DETECCIÓN IgG

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	5,27
CN	10	8,75
CO	10	8,15

C.V. Coeficiente de variación

DETECCIÓN IgM

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	3,43
CN	10	11,28
CO	10	5,33

C.V. Coeficiente de variación

• **REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:**

Se ensayaron 10 muestras en determinación IgG y 6 en determinación IgM caracterizadas positivas frente a otros microorganismos del grupo sindrómico (herpes simplex tipo 2) y *Chlamydomphila pneumoniae*. Se realizó un ensayo IgM a 3 muestras caracterizadas positivas frente a factor reumatoide.









Las muestras ensayadas dieron resultados negativos, demostrando la reacción específica del ensayo sin reacción cruzada o interferencias ocasionadas por los agentes descritos.

• **OTROS ESTUDIOS DE INTERFERENCIAS:**

Se realizó un ensayo ELISA para determinación de anticuerpos IgG e IgM a 15 muestras con anticuerpos antinucleares y 25 muestras con factor reumatoide previamente caracterizadas frente a 4 kits ELISA diferentes (3 antígenos virales y un antígeno bacteriano). Para determinación IgM las muestras fueron tratadas con sorbente anti-IgG. Se demostró la eficacia del tratamiento con sorbente para evitar interferencias en IgM ocasionadas por factor reumatoide en un 100% y en un 96% para anticuerpos antinucleares.

Se ha comprobado la eficacia del sorbente recomendado para evitar la aparición de falsos negativos por exceso de IgG.

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-y°C
	Contiene suficiente para <n> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	<X> pocillos

BIBLIOGRAFÍA:

- Bas, S., P. Muzzin, B. Ninet, J. E. Bornand, C. Scieux, and T. L. Vischer. 2001. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *J Clin Microbiol* 39:1368-77.
- Finn, M. P., A. Ohlin, and 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.
- Forsey, T., K. Stainsby, P. H. Hoger, G. L. Ridgway, S. Darougar, and U. Fischer-Brugge. 1986. Comparison of two immunofluorescence tests for detecting antibodies to *C. trachomatis*. *Eur J Epidemiol* 2:163-4.
- Gonen, R., Y. Shemer-Avni, P. A. Csango, B. Sarov, and 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.
- Jones, R. B., S. C. Bruins, and W. J. Newhall 5th. 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.
- Mahony, J. B., J. Schachter, and M. A. Chernesky. 1983. Detection of antichlamydial immunoglobulin G and M antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 18:270-5.
- Ossewaarde, J. M., A. de Vries, J. A. van den Hoek, and A. M. van Loon. 1994. Enzyme immunoassay with enhanced specificity for detection of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 32:1419-26.
- Piura, B., I. Sarov, B. Sarov, D. Kleinman, W. Chaim, and V. Insler. 1985. Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. *Eur J Epidemiol* 1:110-6.
- Raymond, J., P. Duc-Goiran, S. Joundy, J. Orfila, and J. Acar. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay using three different antigen preparations for detection of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. *Eur J Clin Microbiol* 4:468-72.
- Yong, E. C., J. S. Chinn, H. D. Caldwell, and C. C. Kuo. 1979. Reticulate bodies as single antigen in *Chlamydia trachomatis* serology with microimmunofluorescence. *J Clin Microbiol* 10:351-6.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:

customerservice@vircell.com

REVISADO: 2018-06-28

L-G/M1017-ES-01

