

CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE ELISA IgM

Producto para diagnóstico *in vitro*

M1007: Prueba inmunoenzimática indirecta para determinar anticuerpos IgM frente a *Chlamydomphila pneumoniae* en suero/plasma humano. 96 tests.

INTRODUCCIÓN:

Chlamydia tiene gran capacidad para producir infección respiratoria, especialmente bronquitis y neumonía. Las especies más implicadas en la producción de enfermedades respiratorias son *Chlamydomphila psittaci* y *Chlamydomphila pneumoniae*. La mayor incidencia se presenta en personas mayores y se le considera responsable de un 10% de todas las neumonías, aunque para algunos, es la causa más frecuente del total de casos en los que se consigue conocer la etiología. *C. pneumoniae* se asocia a la aparición de enfermedad ateromatosa y al infarto de miocardio. La seroprevalencia a *C. pneumoniae* es baja en niños pero puede ser superior al 50% en adultos. En la primoinfección suele aparecer IgM de forma más precoz que la IgG y en las reinfecciones es infrecuente la aparición de IgM, pero la seroconversión de IgG es más precoz. En la prueba se utiliza como antígeno COMP (complexes of outer membrane proteins) de *C. pneumoniae*, eliminando el LPS responsable de la mayor parte de las reacciones cruzadas con otras Chlamydias.

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 amarrillo 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 CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con antígenos purificados (Complexes of Outer Membrane Proteins) de *C. pneumoniae*, cepa CM-1 (ATCC VR-1360).

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.

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

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

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

6 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 termostatzado.

Espectrofotómetro de placas de ELISA con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm.

-Agua destilada.

-Alternativamente procesador automático de ELISA.

-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 de 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. 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. 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 muestras 2, y seguidamente 5 µl del control positivo 3, 5 µl del suero cut off 4 (en duplicado) y 5 µl del control negativo 5 en los pocillos correspondientes.
6. 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 IgM 6 a todos los pocillos.
10. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 30 minutos 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. pneumoniae* de tipo IgM.

Las muestras con índices superiores a 11 se considera que tienen anticuerpos específicos frente a *C. pneumoniae* de tipo IgM.

LIMITACIONES DEL MÉTODO:

- Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
- 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.
- 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.
- El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
- La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.

6. 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.

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

8. Los datos serológicos deben ser valorados en el contexto clínico del enfermo para llegar a un adecuado diagnóstico. En la infección primaria por *C. pneumoniae* se suele encontrar aparición de IgM, y a las 3-6 semanas del comienzo de la enfermedad niveles de IgG elevados. Por el contrario, en la reinfección la respuesta de IgM no se presenta. Se presenta una rápida elevación de los niveles de IgG e IgA. La seroprevalencia a *C. pneumoniae* es alta en adultos y por tanto la presencia de anticuerpos no es indicativa de infección reciente. La titulación de las muestras positivas por microinmunofluorescencia puede ayudar a confirmar el diagnóstico. Esta prueba no está diseñada para medir el estado inmune frente a *C. pneumoniae*, sino para detectar niveles de anticuerpos frente a esta infección.

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

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

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

12. No se ha evaluado el rendimiento de la técnica en enfermedades producidas por *C. pneumoniae* diferentes a neumonía.

13. 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 61 muestras de suero/plasma con CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE ELISA IgM frente a un ensayo de inmunofluorescencia. Se obtuvieron los siguientes resultados:

| | Nº muestras | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|----------|-------------|------------------|-------------------|
| IgM | 61 | 91 | 98 |
| 95% C.I. | | 62-98 | 89-100 |

C.I. Intervalo de confianza

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.

• PRECISIÓN INTRAENSAYO:

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 | 1,56 |
| CN | 10 | 10,35 |
| CO | 10 | 4,16 |

C.V. Coeficiente de variación



• PRECISIÓN INTERENSAYO:

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 | 3,97 |
| CN | 10 | 13,29 |
| CO | 10 | 5,59 |

C.V. Coeficiente de variación

• REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:

Se ensayaron 12 muestras caracterizadas positivas frente a otras bacterias del grupo sindrómico (*Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* y *Mycoplasma pneumoniae*), frente a *Rickettsia conorii* y *Chlamydia trachomatis*. Se realizó un ensayo IgM a 2 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:

- Almirall, J., I. Morato, F. Riera, A. Verdaguer, R. Priu, P. Coll, J. Vidal, L. Murgui, F. Valls, F. Catalan, and a. I. et. 1993. Incidence of community-acquired pneumonia and *Chlamydia pneumoniae* infection: a prospective multicentre study. Eur Respir J 6:14-8.
- 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.

3. Black, C. M., J. E. Johnson, C. E. Farshy, T. M. Brown, and B. P. Berdal. 1991. Antigenic variation among strains of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 29:1312-6.

4. Ekman, M. R., M. Leinonen, H. Syrjala, E. Linnanmaki, P. Kujala, and P. Saikku. 1993. Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia during an epidemic in Finland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 12:756-60.

5. Everett, K. D., R. M. Bush, and A. A. Andersen. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2:415-40.

6. Freidank, H. M., H. Vogege, and K. Eckert. 1997. Evaluation of a new commercial microimmunofluorescence test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Chlamydia psittaci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16:685-8.

7. Gutierrez, J., J. Mendoza, F. Fernandez, J. Linares-Palomino, M. J. Soto, and M. C. Maroto. 2002. ELISA test to detect *Chlamydia pneumoniae* IgG. J Basic Microbiol 42:13-8.

8. Heiskanen-Kosma, T., M. Korppi, C. Jokinen, S. Kurki, L. Heiskanen, H. Juvonen, S. Kallinen, M. Sten, A. Tarkiainen, P. R. Ronnberg, M. Kleemola, P. H. Makela, and M. Leinonen. 1998. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. Pediatr Infect Dis J 17:986-91.

9. Jauhainen, T., T. Tuomi, M. Leinonen, J. D. Kark, and 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.

10. Kauppinen, M. and P. Saikku. 1995. Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis 21 Suppl 3:S244-52.

11. Kuo, C. C., L. A. Jackson, L. A. Campbell, and J. T. Grayston. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin Microbiol Rev 8:451-61.

12. Ladany, S., C. M. Black, C. E. Farshy, J. M. Ossewaarde, and R. C. Barnes. 1989. Enzyme immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). J Clin Microbiol 27:2778-83.

13. Numazaki, K., T. Ikebe, and S. Chiba. 1996. Detection of serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* by ELISA. FEMS Immunol Med Microbiol 14:179-83.

14. Steinhoff, D., H. Lode, G. Ruckdeschel, B. Heidrich, A. Rolfs, F. J. Fehrenbach, H. Mauch, G. Hoffken, and J. Wagner. 1996. *Chlamydia pneumoniae* as a cause of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Berlin. Clin Infect Dis 22:958-64.

15. Thom, D. H., J. T. Grayston, L. A. Campbell, C. C. Kuo, V. K. Diwan, and S. P. Wang. 1994. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13:785-92.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:
customerservice@vircell.com

REVISADO: 2018-06-28
L-M1007-ES-01

