

RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM

REF KGM3101



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. Las pruebas RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM son inmunoensayos enzimáticos para la determinación de anticuerpos IgG o IgM contra todas las especies de *Chlamydia* (C.) en suero humano.

Las pruebas deben usarse para la confirmación cuando exista sospecha de infección por *Chlamydia* o para aclarar el estado inmunitario.

2. Resumen y descripción del ensayo

El grupo de *Chlamydia* está formado por tres patógenos humanos: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydochila psittaci* y *Chlamydochila pneumoniae*.

Chlamydia trachomatis es el patógeno bacteriano de transmisión sexual más frecuente, y suele causar uretritis, cervicitis o salpingitis. Los recién nacidos de madres infectadas pueden presentar conjuntivitis o neumonía. Algunos serovares dan lugar a linfogranuloma venéreo. La conjuntivitis tracomatosa que se transfiere mediante infección por contacto se debe a otros serovares.

Hasta hace pocos años, se consideraba generalmente que *Chlamydia pneumoniae* era una subespecie de *Chlamydia psittaci*. La existencia de esta tercera especie de *Chlamydia* se estableció en 1989. Los estudios más recientes han dado lugar a la formación del género independiente *Chlamydochila*. Dependiendo de factores específicos del huésped, *Chlamydochila pneumoniae* puede dar lugar a enfermedades agudas del aparato respiratorio superior, los bronquios y los pulmones. Los resultados de la investigación sugieren que *Chlamydochila pneumoniae* interviene en el asma, las enfermedades pulmonares y otras afecciones crónicas.

Chlamydochila psittaci es un patógeno muy común en aves y mamíferos. En los humanos, se observa raramente y suele causar enfermedades respiratorias.

Es necesario realizar una prueba de tejido (hisopo) o una determinación de anticuerpos en suero para diagnosticar una infección por *Chlamydia*. Se suele preferir la determinación de anticuerpos cuando es difícil enriquecer el antígeno o cuando las cantidades de antígeno son indetectables. Mediante el uso de antígenos LPS (LPS = lipopolisacárido) específicos de *Chlamydia*, se detectan simultáneamente los anticuerpos contra las tres especies.

3. Principio del ensayo

Se recubre una placa de micropocillos con una capa de LPS purificados. Los anticuerpos en las muestras del paciente se unen a los antígenos y se detectan durante la segunda fase de incubación mediante anticuerpos anti-humanos marcados con enzimas (el conjugado). La enzima convierte el substrato incoloro (H_2O_2/TMB) en un producto final de color azul. La reacción enzimática se detiene agregando ácido sulfúrico y el color de la mezcla cambia de azul a amarillo al mismo tiempo. La medición final se realiza a 450 nm en un fotómetro, con una longitud de onda de referencia de 620 nm.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones)

			KGM3101 IgG/IgM
Plate	96 det.	Placa de micropocillos, 12 tiras de micropocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con antígeno LPS de <i>Chlamydia</i>	X
Diluent	25 ml	Búfer para muestras, listo para usar; color azul, tamponado con fosfatos; contiene estabilizadores proteicos, Neolone y Bronidox	X
Wash	50 ml	Búfer de lavado, (concentrado 20x); búfer de fosfatos, contiene tween 20 y proclin	X
Control IgG +	500 µl	Control positivo IgG, suero humano; contiene Neolone y Bronidox	X
Control IgM +	500 µl	Control positivo IgM, suero humano; contiene Neolone y Bronidox	X
Control IgG -	500 µl	Control negativo IgG, suero humano; contiene Neolone y Bronidox	X
Control IgM -	500 µl	Control negativo IgM, suero humano; contiene Neolone y Bronidox	X
Valor de corte de IgG	500 µl	Control de corte IgG, suero humano; contiene Neolone y Bronidox	X
Valor de corte de IgM	500 µl	Control de corte IgM, suero humano; contiene Neolone y Bronidox	X
Conjugado de IgG	15 ml	Conjugado de IgG anti-humana, listo para usar; anticuerpos conjugados con peroxidasa en búfer de color naranja; contiene Neolone y Bronidox	X
Conjugado de IgM	15 ml	Conjugado de IgM anti-humana, listo para usar; anticuerpos conjugados con peroxidasa en búfer de color naranja; contiene Neolone y Bronidox	X
Substrato	15 ml	Substrato; H ₂ O ₂ /tetrametilbencidina; listo para usar	X
Stop	15 ml	Reactivo de parada ácido sulfúrico 0,5 M; listo para usar	X

5. Instrucciones de almacenamiento

- El kit de prueba debe almacenarse a 2 - 8 °C y puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
- El búfer de lavado diluido puede usarse durante 4 semanas como máximo si se almacena a 2 - 8 °C.
- Para todos los demás reactivos, se aplica la fecha de caducidad indicada en el envase para el almacenamiento a 2 - 8 °C

- Una vez alcanzada la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- La bolsa de aluminio que contiene la placa de micropocillos debe abrirse sin que se rompa el precinto de seguridad. Todas las tiras de micropocillos que no se necesiten deben regresarse inmediatamente a la bolsa de aluminio y almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

Debe evitarse la contaminación de los reactivos y el sustrato incoloro debe protegerse de la exposición a la luz directa.

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada
- **Vircell ELISA SORBENT (Ref. Vircell S001)** (ver la sección 9.3.)

6.2. Accesorios

- Incubadora o cámara húmeda a 37 °C
- Tubos de ensayo
- Mezclador vórtex
- Micropipetas para volúmenes de 10-100 µl y 100-1000 µl
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Equipo de limpieza de microplacas o pipeta multicanal
- Lector de microplacas (450 nm, longitud de onda de referencia 620 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben seguirse estrictamente las directrices para el trabajo en laboratorios médicos y las instrucciones para la realización del ensayo.

No pipetee las muestras ni los reactivos con la boca y evite el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Utilice guantes desechables para manipular las muestras y lávese las manos al terminar el ensayo. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se usen las muestras o los reactivos del ensayo.

Para obtener más información, consultar las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

Los sueros de control del kit (control positivo, control negativo y control de corte) se han analizado para detectar anticuerpos contra VIH y VHC, y el antígeno de superficie de la hepatitis B, con resultados negativos. No obstante, deben tratarse como

potencialmente infecciosos, igual que las muestras de pacientes y todos los demás materiales con los que entren en contacto, y deben manipularse de acuerdo con las reglas de seguridad nacionales pertinentes.

El peróxido de hidrógeno (substrato) puede causar quemaduras. Manipular con cuidado. Si la piel se contamina con el reactivo de parada, enjuáguela con agua.

El reactivo de parada contiene ácido sulfúrico 0,5 M. Evite el contacto con la piel y la ropa. Si la piel se contamina con el reactivo de parada, enjuáguela con agua.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o esterilizarse en autoclave a 121 °C durante 1 hora como mínimo.

Nota: Para evitar la formación de gases venenosos, todos los residuos líquidos que contengan reactivo de parada se deben neutralizar antes de agregarlos a la solución de hipoclorito.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

El ensayo se desarrolló para evaluar muestras de suero humanas. Tras la recogida de la sangre, se debe separar la sangre de los coágulos sanguíneos lo antes posible para evitar la hemólisis. Las muestras deben conservarse en frío o congeladas hasta el momento de realizar el ensayo. Deberán evitarse a toda costa los ciclos repetidos de congelación y descongelación de las muestras, así como la contaminación microbiana. El uso de muestras turbias, ictéricas, hemolíticas, lipémicas o termoinactivadas puede dar lugar a resultados falsos.

Tabla 2: Almacenamiento de muestras

Suero o plasma sin diluir	
2-8 °C	-20 °C
1 semana	>1 semana

9. Ejecución de la prueba

9.1. Información general

Todos los reactivos y la placa de micropocillos deben alcanzar la temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de usarlos. Las tiras de micropocillos no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no estén a temperatura ambiente. Los reactivos deben mezclarse bien inmediatamente antes de su uso. Tras el uso, el kit debe volver a almacenarse inmediatamente a entre 2 y 8 °C.

Tomar únicamente el volumen de reactivos que sea necesario para la ejecución de la prueba. No volver a verter los reactivos en los viales, ya que esto puede ocasionar su contaminación.

Las placas de micropocillos no pueden utilizarse más de una vez. No utilice los reactivos ni las tiras de micropocillos si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

El búfer de muestra, el búfer de lavado, el sustrato y el reactivo de parada no son específicos del ensayo; también pueden utilizarse en otros RIDASCREEN® ELISA para detectar anticuerpos contra *Chlamydia*.

9.2. Preparación del búfer de lavado

Mezclar 1 parte de búfer de lavado concentrado [Wash] con 19 partes de agua destilada. Para esto, añadir 50 ml de concentrado a una probeta de 1000 ml y aforar la solución a 1000 ml con agua destilada. Todos los cristales presentes en el concentrado deben disolverse previamente calentando en baño maría a 37 °C. El búfer de lavado diluido se puede utilizar durante un máximo de 4 semanas siempre que se haya almacenado a 2 - 8 °C.

9.3 Preparación de la muestra

Diluir las muestras de suero y los controles en proporción 1:21 con el búfer de muestras de [Diluent] antes de iniciar la prueba. Realizar la dilución directamente en la placa de micropocillos. El control de corte debe determinarse por duplicado. Se deben usar los controles que correspondan a la determinación (IgG o IgM).

- A1 Control negativo
- B1 Control de corte
- C1 Control de corte
- D1 Control positivo
- E1, F1 Muestra del paciente 1, 2, etc.

Después de colocar un número suficiente de pocillos para los controles y las muestras en el portatiras, pipetear 100 µl de búfer para muestras en cada micropocillo de la placa para la determinación de IgG, y después agregar 5 µl de muestra o control. La placa debe ponerse a vibrar brevemente para mezclar.

IgG:

muestra y controles -> 100 µl de [Diluent] + 5 µl de muestra o control

Para las determinaciones de IgM, las muestras de la placa deben someterse a la absorción de la IgG (por ejemplo, con Vircell ELISA SORBENT (Ref. Vircell S001)) y solo después pueden ajustarse con el búfer para muestras a la dilución requerida para la prueba. Cuando se utilice Vircell ELISA SORBENT S0001, realizar lo siguiente:

IgM:

controles -> 100 µl de [Diluent] + 5 µl de control

muestra -> 25 µl de Vircell ELISA SORBENT S0001 + 5 µl de muestra + 75 µl de [Diluent]

Nota: No se deben absorber los controles.

9.4. Primera incubación

Incubar la placa durante 45 minutos a 37 °C en una incubadora o cámara húmeda. Durante este proceso, el fondo de los pocillos no debe entrar en contacto con materiales termoconductores (como metales o papel húmedo). La placa de micropocillos debe cubrirse durante la incubación.

Nota: La placa de micropocillos no debe colocarse en un recipiente de incubación frío que alcance los 37 °C durante la incubación. La temperatura del recipiente debe ajustarse previamente a 37 °C.

9.5. Lavado

Los pocillos se deben vaciar en un recipiente de residuos que contenga solución de hipoclorito para su desinfección. A continuación, golpear la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. Después, lavar la placa 5 veces con 300 µl de búfer de lavado diluido cada vez. Después de cada lavado, golpear los pocillos sobre una parte no utilizada del papel absorbente para verificar que estén completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas, asegurarse de que la máquina esté ajustada correctamente al tipo de placa utilizado. Después del lavado, golpear la placa sobre papel absorbente para eliminar cualquier resto de humedad.

9.6. Segunda incubación

Agregar 100 µl de conjugado **Conjugate IgG** o **Conjugate IgM** a cada uno de los pocillos correspondientes. A continuación, cubrir la placa e incubarla a 37 °C durante 30 minutos (ver la sección 9.4).

9.7. Lavado

Lavar 5 veces conforme a la sección 9.5.

9.8. Tercera incubación

Agregar 100 µl de sustrato **Substrate** a cada pocillo. Después, cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, protegida de la luz. A continuación, parar la reacción añadiendo 50 µl de reactivo de parada **Stop** a cada pocillo. Después de mezclar con cuidado (golpeando ligeramente en el lateral de la placa), medir la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia 620 nm) en un fotómetro de placas. Calibrar a cero con aire. La medición debe realizarse en la hora siguiente a la adición del reactivo de parada.

Nota: Cuando se utilice una cámara húmeda, es necesario limpiar la parte inferior de la placa de micropocillos para eliminar el agua de condensación antes de llevar a cabo la medición.

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

A efectos de control de calidad, se deben incluir los controles positivo, negativo y de corte cada vez que se lleve a cabo el ensayo. El control de corte se determina por duplicado y el valor promedio se calcula a partir de las dos mediciones. El ensayo se llevó a cabo correctamente si los valores de extinción (DO) de los controles cumplen con los siguientes criterios:

Tabla 3: Criterios de control de calidad

	DO
Control negativo	<0,5
Control de corte	>0,55 <1,5
Control positivo	>0,9

Si los valores difieren de los requeridos, si el reactivo está turbio o el substrato se pone azul antes de agregarlo a los pocillos, es posible que los reactivos estén caducados.

Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos usados (p. ej., calibración)
- Ejecución correcta de la prueba
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas.

No utilizar soluciones de substrato que hayan virado a color azul.

Si tampoco se alcanzan los valores estipulados después de repetir la prueba, ponerse en contacto con el distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1 Cálculo del índice de la muestra

1. La absorbancia promedio se calcula para el control de corte.
2. El índice de la muestra se obtiene dividiendo la absorbancia de la muestra entre el valor promedio calculado.

Por ejemplo: DO del control de corte 1 = 0,821
DO del control de corte 2 = 0,865
Valor promedio = 0,843
DO de las muestras = 1,508

$$\text{Muestra Índice} = \frac{1,508}{0,843} = 1,789$$

11.2 Interpretación de los resultados

Tabla 4: Análisis del índice de la muestra

	negativo	ambiguo	positivo
Índice de la muestra	<0,9	0,9 – 1,1	>1,1

12. Limitaciones del método

El ensayo de ELISA RIDASCREEN® Chlamydia IgG/IgM detecta anticuerpos IgG o IgM contra las tres especies de *Chlamydia* patógenas para los seres humanos. El ensayo no se puede usar para derivar una relación entre la extinción determinada y la aparición de síntomas clínicos graves. El ensayo no es adecuado para determinar el lugar de la infección. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico y otros métodos diagnósticos (como el aislamiento del patógeno).

Un resultado negativo no descarta una infección, ya que la muestra de suero puede haberse tomado demasiado pronto para que los anticuerpos fueran detectables. En este caso, si hay sospecha de infección por razones clínicas, se debe repetir el ensayo con una segunda muestra del suero obtenido dos o tres semanas más tarde.

Siempre deben obtenerse dos muestras de suero consecutivas de un paciente y someterse a las pruebas serológicas en paralelo para mejorar la calidad del diagnóstico. El progreso del título es importante para interpretar los hallazgos.

Los hallazgos de IgG positiva en niños recién nacidos deben interpretarse con cuidado, ya que pueden corresponder a anticuerpos maternos. La detección de anticuerpos IgM es más útil para los niños menores de seis meses.

Los títulos muy altos de IgG pueden dar lugar a resultados negativos falsos en las determinaciones de IgM. Además, las determinaciones de IgM pueden dar lugar a resultados positivos falsos debido a factores reumatoides. Esto puede evitarse con la absorción del suero antes de llevar a cabo el ensayo (ver la sección 9.3.).

No se investigaron las reacciones cruzadas con anticuerpos contra *Chlamydomphila psittaci* debido a la baja prevalencia de esta enfermedad y a la falta de muestras positivas cuando se utiliza la prueba disponible.

La respuesta inmunitaria cuando los ojos se infectan con *C. trachomatis* es pequeña. No se ha validado la idoneidad del ensayo para el control del tratamiento. No se ha investigado la relevancia del ensayo para enfermedades crónicas en niños, pacientes con linfogranuloma venéreo (LGV) ni inflamaciones pélvicas crónicas.

Un resultado positivo no descarta la presencia de otro patógeno infeccioso como causa de la enfermedad.

13. Características de rendimiento

Tabla 5: Varianza interensayo (n = 10)

Varianza interensayo	IgG	IgM
	CV	CV
Control positivo	3,22 %	2,62 %
Control negativo	10,99 %	9,24 %
Control de corte	5,00 %	7,36 %

Tabla 6: Varianza intraensayo (n = 10)

Varianza intraensayo	IgG	IgM
	CV	CV
Control positivo	1,83 %	2,16 %
Control negativo	6,98 %	8,00 %
Control de corte	6,55 %	7,79 %

Tabla 7: Sensibilidad y especificidad en comparación con el ensayo de microinmunofluorescencia (MIF)

	IgG	IgM
Número de muestras	101	62
Sensibilidad	96 %	92 %
Especificidad	98 %	100 %

También se realizó utilizó el ensayo de IgG con 11 muestras de pacientes infectados con *Rickettsia conorii* u otros patógenos que causan cuadros clínicos similares al de *Chlamydia* (VHS-2, *L. pneumophila*, *C. burnetii* y *M. pneumoniae*). Siete de estas










muestras se examinaron con el ensayo de IgM, así como dos sueros positivos para factor reumatoide. No se observaron reacciones cruzadas ni efectos en los resultados de ELISA con los sueros usados.

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y nombre
2015-11-01	Versión de lanzamiento
2018-08-15	Revisión general
2018-09-20	Adaptación del símbolo CE (n.º de identificación del organismo notificado)
2019-12-16	Revisión 6.1. Reactivos Revisión 9.3. Preparación de la muestra

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Seguir las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos de prueba

Plate	Placa de microtitulación
Diluent	Búfer de dilución de muestras
Wash	Búfer de lavado 20x
Control IgG +	Control positivo de IgG
Control IgM +	Control positivo de IgM
Control IgG -	Control negativo de IgG
Control IgM -	Control negativo de IgM
Valor de corte de IgG	Control de corte de IgG
Valor de corte de IgM	Control de corte de IgM
Conjugado de IgG	Conjugado de IgG
Conjugado de IgM	Conjugado de IgM
Substrato	Substrato
Stop	Reactivo de parada

16. Bibliografía

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Numazaki, K., T. Ikebe, and 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, and A. M. van Loon. 1994. Enzyme immunoassay with enhanced specificity for detection of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 32:1419-26.