

INTENCIÓN DE USO

El kit Chlamydia Trachomatis IgG ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgG de Chlamydia Trachomatis en suero o plasma humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

Chlamydia Trachomatis es un parásito intracelular patógeno cuya pared celular es similar en estructura a bacterias gram-negativas. Esta es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más común. En los Estados Unidos se reportan más de 4 millones de casos cada año. Los principales sitios de infección incluyen el tracto génito urinario y el recto, aunque también puede resultar en conjuntivitis, peri hepatitis y artritis reactiva. La infección es habitualmente asintomática, dificultando así su diagnóstico. Alrededor de dos tercios de las mujeres infectadas son asintomáticas. Las mujeres desarrollan cervicitis muco purulento; un irregular sangrado menstrual o dolor abdominal, puede ocurrir en un 40% de estas mujeres. Síntomas de Dolor Inflamatorio Pelvico (DIP), se observa en un 5% de estas mujeres. La infección es habitualmente sintomática en hombres, con disuria y descarga de líquido blanquecino transparente. La aparición de Epidermitis es común. La infección tiene un periodo de incubación de entre 7 y 21 días y comúnmente se la encuentra con un segundo patógeno de ETS. Los anticuerpos IgG e IgM a Chlamydia Trachomatis pueden ser encontrados por entre dos y cuatro semanas después del contagio. IgG se mantiene positivo, pero el nivel de anticuerpo puede decrecer con el tiempo. El kit ELISA puede detectar Chlamydia Trachomatis IgM aun cuando hayan pasado muchos meses de la infección.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgG específico, en caso de estar presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y el conjugado enzimático es agregado para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, en caso de estar presente. El exceso de conjugado enzimático es lavado para luego agregar el sustrato. La microplaca es incubada a efectos de permitir la hidrolización del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgG específico en la muestra.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos antígeno C. Trachomatis	12x8x1
2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar)	22 ml
3. Calibrador: 1 Vial (listo para usar)	1ml
4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar)	1ml
5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usar)	1ml
6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)	12ml
7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)	12ml
8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)	12ml
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco	25ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrulado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984:
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare 1X de solución de trabajo a 1:20 con el diluyente de ensayo. Conserve a temperatura ambiente (18-26°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µl de la muestra a 200 µl del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 100 µl del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100 µl de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µl de solución de frenado.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

EJEMPLO DE LA MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador O.D.	0.8
Factor de Calibración (CF)	0.5
Valor Punto de Corte	0.4
Control Positivo O.D.	1.2
Anticuerpo Índice	3.0
Muestra del Paciente O.D.	1.6
Anticuerpo Índice	4.0

CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser mayor que 0.250.
2. El Anticuerpo Índice para control negativo debe ser menor que 0.9.
3. El Anticuerpo Índice para control positivo debe ser menor que 1.2.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.9 Anticuerpo no detectado de C Trachomatis IgG por ELISA

0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 Anticuerpo detectado de C Trachomatis IgG por ELISA

PERFORMANCE

1. Sensibilidad y Especificidad:

246 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 122 sueros resultaron positivos y 118 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 96%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	C Trachomatis IgG ELISA		
	+	-	Total
Kit de Referencia ELISA	119	4	123
-	6	117	123
Total	125	121	246

2. Precisión:

Estudio Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	16	1.87	0.092	4.92
2	16	1.22	0.067	5.49
3	16	0.28	0.018	6.43

Estudio Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	10	1.61	0.142	4.92
2	10	1.26	0.107	5.49
3	10	0.24	0.022	9.16

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico
2. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

REFERENCIAS

1. Poussin M; Fuentes V; Corbel C; Prin L; Eb F; Orfila J. Capture-ELISA: a new assay for the detection of immunoglobulin M isotype antibodies using Chlamydia trachomatis antigen. J Immunol Methods, 1997; 204(1):1-12.
2. Dereli D; Coker M; Ertem E; Serter D; Tana,c R; Tez E. Chlamydial infection in infants. J Trop Pediatr 1996; 42(4):233-6.
3. Bas S; Cunningham T; Kvien TK; Glenn as A; Melby K; Vischer TL. The value of isotype determination of serum antibodies against Chlamydia for the diagnosis of Chlamydia reactive arthritis. Br J Rheumatol 1996; 35(6):542-7
4. Gencay M; Koskiniemi M; Saikku P; Puolakkainen M; Raivio K; Koskela P; Vaheri A. Chlamydia trachomatis seropositivity during pregnancy is associated with prenatal complications Clin Infect Dis 1996; 21(2):424-6.
5. Verkooyen RP; Van Lent NA; Mousavi Joulandan SA; Snijder RJ; van den Bosch JM; Van Helden HP; Verbrugh HA. Diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease by micro-immunofluorescence and ELISA. J Med Microbiol 1997; 46(11):959-64