

ELISA de quimioluminiscencia Clamidia tracomatis IgG

(96 pruebas)

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Paso	(20-25°C Temp. ambiente)	Volumen	Tiempo de incubación
1	Dilución de la muestra 1:40 = 5 µl / 200 µl		
2	Muestras diluidas, calibrador y controles	100 µl	30 minutos
3	Tampón de lavado (3 veces)	350 µl	
4	Conjugado enzimático	100 µl	30 minutos
5	Tampón de lavado (3 veces)	350 µl	
6	Mezcla de sustrato A y sustrato B	100 µl	5 minutos
7	Lectura con luminómetro en 5~30 minutos		

NOMBRE Y USO PREVISTO

El ELISA de quimioluminiscencia para IgG de Chlamydia Trachomatis está diseñado para evaluar el estado serológico de un paciente frente a la infección por Chlamydia Trachomatis. También se utiliza para evaluar sueros emparejados para detectar la presencia de un aumento significativo de IgG específica como indicativo de una infección reciente o actual por Chlamydia Trachomatis.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Chlamydia Trachomatis es uno de los patógenos humanos más comunes. De los 15 serotipos reconocidos, se ha demostrado que 4 (A, B, Ba y C) causan tracoma cegador hiperendémico, una enfermedad que afecta a cientos de millones de personas en los países en desarrollo. Tres serotipos (L-1, L-2 y L-3) son los causantes del linfogranuloma venéreo (LGV), una enfermedad sistémica de transmisión sexual. Los otros serotipos (D a K) se han asociado a infecciones del tracto genital y a casos esporádicos de conjuntivitis en las sociedades industrializadas. Estos agentes son la principal causa reconocida de uretritis no gonocócica en los hombres, en los que también pueden causar epididimitis. En las mujeres, C. trachomatis causa cervicitis y se ha asociado a salpingitis aguda. Los bebés nacidos a través de un canal de parto infectado pueden contraer la infección y desarrollar conjuntivitis de inclusión del recién nacido y/o el síndrome de neumonía clamidial característico.

Los niveles elevados de anticuerpos IgG anti-Chlamydia tienen valor diagnóstico en infecciones crónicas o sistémicas como salpingitis, infertilidad mecánica, perihepatitis, epididimitis, síndrome de Reiter y neumonitis.

Chlamydia Trachomatis IgG Chemiluminescence ELISA test emplea el antígeno de reacción amplia LGV tipo 2 de Chlamydia Trachomatis. Detectará anticuerpos de Chlamydia Trachomatis, Chlamydia Psittaci y Chlamydia Pneumoniae (TWAR).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El antígeno purificado de Chlamydia Trachomatis se recubre en la superficie de micropocillos. El suero diluido del paciente se añade a los pocillos, y el anticuerpo específico IgG de Chlamydia Trachomatis, si está presente, se une al antígeno. Se lavan todos los materiales no unidos. Después de añadir el conjugado enzimático, éste se une al complejo anticuerpo-antígeno. Se lava el exceso de conjugado enzimático y se añade la mezcla de sustrato A y sustrato B. La luz generada (RLU) es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico IgG en la muestra. Los resultados se leen en un luminómetro de micropocillos y se comparan de forma paralela con el calibrador y los controles.

MATERIAL SUMINISTRADO

1. Tiras de micropocillos: Pocillos recubiertos de antígeno de Chlamydia Trachomatis
2. Diluyente de la muestra: Solución de color azul. 1 vial (22 ml)
3. Calibrador: Valor del factor (f) indicado en la etiqueta. 1 vial (150µl)
4. Control negativo: Rango indicado en la etiqueta. 1 vial (150µl)
5. Control positivo: Rango indicado en la etiqueta. 1 vial (150µl)
6. Concentrado de lavado (H) 20x. 1 frasco (50 ml)

7. Conjugado enzimático: Solución de color rojo. 1 vial (12 ml)
8. Substrato A: H₂O₂ en buffer. 1 vial (6 ml)
9. Substrato B: Luminol en buffer. 1 vial (6 ml)

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacenar el kit a 2 - 8 C.º
2. Mantenga siempre los micropocillos herméticamente cerrados en la bolsa con desecantes. Le recomendamos que utilice todos los pocillos en las 4 semanas siguientes a la apertura inicial de la bolsa.
3. Los reactivos son estables hasta la caducidad del kit.
4. No exponga los reactivos de ensayo al calor, al sol o a una luz intensa durante su almacenamiento o uso.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales potencialmente peligrosos:
El calibrador y los controles contienen componentes de origen humano que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B así como para el anticuerpo del VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, como no existe ningún método de prueba que pueda ofrecer una garantía completa de que el VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos estén ausentes, estos reactivos deben manipularse en el nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda en el manual de los Centros para el Control de Enfermedades/Institutos Nacionales de Salud, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories". 1984
2. No pipetee con la boca. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se manipulen muestras o reactivos del kit.
3. Los componentes de este kit están destinados a ser utilizados como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
4. Este producto contiene componentes conservados con azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre para formar azida metálica explosiva. Al desecharlo, enjuáguelo con un gran volumen de agua.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

1. Recoger muestras de sangre y separar el suero.
2. Las muestras pueden refrigerarse a 2 - 8° C durante un máximo de siete días o congelarse durante un máximo de seis meses. Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra de suero.

PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

1. Preparar 1x buffer de lavado. Preparar el buffer de lavado añadiendo agua destilada o desionizada al concentrado de lavado 20x hasta un volumen final de 1 litro.
2. Llevar todas las muestras y los reactivos del kit a temperatura ambiente (20-25° C) y mezclar suavemente.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Coloque el número deseado de tiras recubiertas en el soporte.
2. Preparar diluciones 1:40 añadiendo 5 µl de las muestras problema, control negativo, control positivo y calibrador a 200 µl de diluyente de muestra. Mezclar bien.
3. Dispensar 100 µl de sueros diluidos, calibrador y controles en los pocillos correspondientes. Para el blanco de reactivo, dispensar 100 µl de diluyente de muestra en la posición 1A del pocillo. Golpee el soporte para eliminar las burbujas de aire del líquido y mezclar bien. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Eliminar el líquido de todos los pocillos. Repetir el lavado tres veces con buffer de lavado.
5. Dispensar 100 µl de conjugado enzimático en cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Eliminar el conjugado enzimático de todos los pocillos. Repetir el lavado tres veces con buffer de lavado.
7. Mezclar igual volumen de Substrato A y Substrato B, luego dispensar 100

- ul de esta mezcla a cada pocillo.
8. Leer RLU con un luminómetro de micropocillos en 5~30 minutos.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Para obtener el valor de corte: Multiplicar las RLU del Calibrador por el Factor (f) impreso en la etiqueta del Calibrador.
- Calcular el Índice IgM de cada determinación dividiendo los valores RLU de cada muestra con el valor RLU obtenido del Cut-off.

NOTA: Este factor (f) es una variable.
Es específico para un lote fabricado e impreso en la etiqueta del calibrador.

Por ejemplo:

Si el valor del factor (f) en la etiqueta = 0,40 900110 x 0,40 = 360044

Muestra	RLU	RLU media (A)	Valor de corte calculado (B)	ÍNDICE A/B	Interpretación
Calibrador f = 0,40	897142 903078	900110	360044		
Control positivo	1449370 1450960	1450165		4.02	Positivo
Control negativo	6556 6978	6767		0.02	Negativo
Paciente Muestra 1	1712547 1800691	1756619		4.88	Positivo
Muestra de pacientes 2	128620 118540	123580		0.34	Negativo

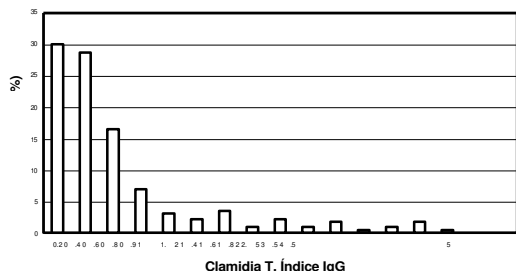
CONTROL DE CALIDAD

- Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los controles deben estar dentro de los márgenes indicados en las etiquetas.
- Los valores de RLU varían según el luminómetro utilizado.
- Cada laboratorio debe ensayar controles a niveles en rangos bajos, normales y elevados para monitorear el desempeño del ensayo. Deben mantenerse tendencias de control de calidad para supervisar la coherencia entre lotes.

INTERPRETACIÓN

Negativo: Un índice IgG de 0,90 o menos es seronegativo para anticuerpos IgG. Equívoco: Un índice IgG de 0,91 - 0,99 es equívoco. La muestra debe volver a analizarse. Positivo: Índice IgG de 1,00 o superior. Valores esperados: Se determinaron 230 muestras aleatorias con Chlamydia Trachomatis IgG Chemiluminescence ELISA. Los resultados de la prueba se calcularon como índice IgG utilizando un suero de referencia elegido (punto de corte) como índice IgG 1. La distribución de la frecuencia frente al índice IgG se presenta como sigue: 29 resultaron positivos (12,6%) y 196 negativos (85,2%).

Histograma del índice IgG de Chlamydia T. Muestras totales n=230



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Una sola muestra de suero no puede utilizarse para determinar una infección reciente.
- Una muestra de suero tomada en una fase temprana durante la fase aguda de la infección puede contener niveles bajos de anticuerpos IgG y hacer que el resultado del Índice IgG sea negativo.
- Al igual que con otros ensayos serológicos, los resultados de estos ensayos de b e n utilizarse junto con la información disponible de la evaluación clínica y otros procedimientos de diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad y especificidad:

La sensibilidad, especificidad y exactitud se evaluaron utilizando un kit ELISA comercial disponible en 104 muestras. Los resultados de la correlación se resumen en la tabla siguiente:

		Kit de referencia		
		N	P	Total
Nuestro kit	N	69(D)	3 (B)	72
	P	1(C)	31 (A)	32
Total		70	34	104

Sensibilidad = $A / (A+B) = 31 / (31+3) = 91,1\%$

Especificidad = $69 / (69+1) = 98,5$

Precisión (acuerdo global) = $(A+D) / (A+B+C+D) = 100 / 104 = 96,1\%$.

Precisión: La precisión del ensayo se evaluó probando tres sueros diferentes ocho réplicas en 3 días. A continuación se resume la C.V. intraensayo e interensayo:

N = 8	Negativo	Bajo positivo	Positivo
Intraensayo	10.9%	10.5%	8.9%
o	12.3%	11.1%	10.5%

Reactividad cruzada:

Se realizó un estudio para determinar la reactividad cruzada de la prueba con los siguientes anticuerpos:

- IgG de VEB, paperas, sarampión y VVZ.
- IgG e IgM de rubéola, toxoplasmosis, CMV, VHS 1 y VHS 2.
- IgM de RF.
- IgG de ANA, anti-ADN ds.

Todas las muestras positivas analizadas dan resultados negativos.

REFERENCIAS

- Schachter, J. 1978. Chlamydial infections. N. Engl. J. Med. 298: 428-435, 490-495, 540-549.
- Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Holoberg, G., Potashnik, G. Sarov, B. e Insler, V. (1986). Specific IgG and IgA Antibodies to Chlamydia trachomatis in Infertile Women. Int. J. Fertil 31: 193-197.
- Kaneti, J. et al. (1988). IgG and IgA Antibodies specific for Chlamydia trachomatis in Acute Epididymitis. Europ. Urol. 14: 323-327.
- Kletter, Y., Caspi, D., Yarom, M., Sarov, B., Sarov, I. Y Tanay, A. Serum IgA and IgG Antibodies Specific to Chlamydia in Patients with Reiter's Syndrome (RS). En: Proceedings of The European Society for Chlamydia Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna. 1988. P. 170.
- Paran, H., Heimer, D. y Sarov, I. (1986). Serological, Clinica and Radiological Findings in Adults with Bronchopulmonary Infections Caused by Chlamydia trachomatis. Isr. J. Med. Sci. 22: 823-827.