



savyonDiAGNOSTICS

SeroCP™ IgM

REF A192-01M

REF B192-01M

Test ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti *Chlamydia pneumoniae* en suero humano

IVD



Exclusivamente para uso profesional

Uso:

El kit SeroCP^{MR} IgM se usa para detección de anticuerpos IgM específicos contra *Chlamydia pneumoniae* en suero humano.

El kit SeroCP^{MR} IgM es un Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) cualitativo, el cual se usa como auxiliar en el diagnóstico de la infección causada por *Chlamydia pneumoniae*.

Para uso en diagnóstico **In Vitro**.

Introducción

Chlamydia pneumoniae (TWAR) es un agente infeccioso que presenta una variedad de manifestaciones clínicas, incluyendo infecciones del tracto respiratorio superior e inferior (1). La mayoría de las infecciones a causa de *C. pneumoniae* son leves o asintomáticas. Sin embargo, puede causar enfermedades serias como la faringitis, sinusitis, bronquitis aguda y neumonía adquirida por la comunidad. Infecciones no detectadas o no tratadas pueden causar enfermedades persistentes y prolongadas. Datos recientes muestran una posible asociación entre infecciones causadas por *C. pneumoniae* y enfermedades crónicas (2). La seroprevalencia de *C. pneumoniae* en niños es baja pero aumenta marcadamente hasta la edad adulta, después de la cual permanece en un nivel alto (>50%).

Dificultades en la recogida de la muestra y la inaccesibilidad de las zonas infectadas, afectan seriamente la utilidad de los métodos de detección directa. Por lo tanto, las pruebas serológicas son utilizadas en forma rutinaria y sirven como método no invasivo en la identificación de infecciones por *Chlamydia* tanto crónicas como pasadas (3), donde los métodos por detección directa son raramente eficientes (4). Asimismo, la presencia de ciertos tipos de anticuerpos son un indicador del estado de la enfermedad. Una infección primaria de *Chlamydia* se caracteriza por una respuesta predominante de IgM dentro de las primeras 2-4 semanas y una respuesta posterior de IgG e IgA dentro de las siguientes 6-8 semanas. Tras una infección aguda por *C. pneumoniae* los anticuerpos IgM desaparecen en la mayoría de los casos transcurridos 2-6 meses (5) y el título de anticuerpos IgG disminuye lentamente; los anticuerpos IgA tienden a desaparecer rápidamente (6). Cuando se sospecha una infección primaria por *Chlamydia*, la presencia de anticuerpos de subclase IgM tiene un elevado valor diagnóstico (7). Sin embargo, en infecciones recurrentes o en infecciones crónicas el nivel de anticuerpos IgM es bajo y es por ello que, la ausencia de IgM no necesariamente excluye una infección en curso.

En reinfección, el título de IgG e IgA incrementa rápidamente, generalmente en una a dos semanas (8). Los anticuerpos de clase IgA han mostrado ser un marcador inmunológico confiable en infecciones primarias, crónicas y recurrentes. Generalmente el título de estos

anticuerpos disminuye rápidamente a niveles basales, una vez que la infección por *Chlamydia* ha sido tratada y erradicada (3). La persistencia de título elevado de anticuerpos IgA se considera un indicador de infección crónica (6).

Los anticuerpos de subclase IgG persisten durante largos periodos y disminuyen lentamente. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos IgG indica principalmente infección por *Chlamydia* desde un tiempo indeterminado. Sin embargo un incremento de 4 veces en el nivel de la IgG o un valor de la IgG muy elevado, pueden indicar una infección crónica en curso.

SeroCP^{MR} es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que utiliza como antígeno cuerpos elementales purificados de *C. pneumoniae* (TWAR-183) para detectar la respuesta inmunológica en humanos. Para un diagnóstico completo de infecciones en curso, crónicas o pasadas, se recomienda determinar la presencia de anticuerpos IgG, IgA e IgM contra *C. pneumoniae*.

Principio del Ensayo

- Las placas de SeroCP^{MR} están recubiertas con cuerpos elementales purificados de *C. pneumoniae* (TWAR 183) como antígeno.
 - El suero a ensayar es diluido e incubado en las placas de SeroCP^{MR} durante 1h a 37°C. En este paso los anticuerpos frente a *C. pneumoniae* se enlazan a los antígenos inmovilizados.
 - Los anticuerpos no específicos se eliminan con los lavados.
 - El anticuerpo anti IgM humana conjugado con peroxidasa (HRP) se agrega e incuba 1h a 37°C. En este paso la peroxidasa conjugada se une al complejo antígeno-anticuerpo previamente formado.
 - El conjugado no unido se elimina con los lavados.
 - Una vez agregado el substrato-TMB, éste es hidrolizado por la peroxidasa y una vez reducido el substrato se torna de color azul.
 - Al agregar la solución de Parada (stop solution), el color azul se vuelve amarillo y debe ser leído en un lector de placas para ELISA a una longitud de onda de 450nm.
 - La absorbancia es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico unido al antígeno inmovilizado.
-

Procedimiento

Agregar 2x50µl de Control Negativo, 1x50µl de Control Positivo y muestras diluidas 1/105 a los pocillos de la microplaca recubierta con antígenos de *C. pneumoniae*

↓
Cubrir la placa e incubar 1h a 37°C con una humedad del 100%

↓
Lavar 3 veces con la solución de lavado (300-350µl Wash Buffer)

↓
Añadir 50µl de peroxidasa conjugada (HRP Conjugate) diluida 1/300

↓
Cubrir la placa e incubar 1h a 37°C con una humedad del 100%

↓
Lavar 3 veces con la solución de lavado (300-350µl Wash Buffer)

↓
Añadir 100µl de substrato TMB (TMB-Substrate)

↓
Cubrir la placa e incubar 15min a temperatura ambiente

↓
Añadir 100µl de la solución de Parada (Stop Solution)
Leer la absorbancia a 450nm

↓
Calcular e interpretar los resultados

Contenido del kit

Kit para 96 determinaciones

Referencia A192-01M

1. **Microplaca recubierta con antígeno de *C. pneumoniae*:** 96 pocillos desarmables (8x12) recubiertos con antígeno de *C. pneumoniae*, empacado en una bolsa de aluminio que contiene una tarjeta con gel de sílice.
1 Placa
2. **Solución de lavado concentrada (20x):** Solución de PBS y Tween.
1 Botella, 100ml
3. **Diluyente de Suero-IgM (rojo):** Anti IgG humana en solución tampón, lista para usar. Contiene menos de 0.05% proclin como conservante.
1 Botella, 60ml
4. **Diluyente de Conjugado (verde):** Una solución tamponada lista para usar. Contiene menos de 0.05% proclin como conservante.
1 Botella, 40ml
5. **Control negativo:** Suero humano negativo a IgM de *C. pneumoniae*, solución lista para usar. Contiene menos de 0.05% Proclin y menos de 0.1% azida sódica como conservantes.
1 frasco, 2.5ml

6. **Control positivo:** Suero humano positivo a IgM de *C. pneumoniae*, solución lista para usar. Contiene menos de 0.05% proclin y menos de 0.1% azida sódica como conservantes.
1 frasco, 2.0ml
7. **Conjugado-HRP concentrado (300X):** Anticuerpo anti IgM humano (específico de cadena μ) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) Contiene menos de 0.05% proclin como conservante.
1 frasco, 0.2ml
8. **Substrato-TMB:** Solución lista para usar. Contiene 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina como cromógeno y peroxidasa como sustrato.
1 Botella, 14ml
9. **Solución de Parada (Stop Solution):**
Solución lista para usar. Contiene H₂SO₄ 1M.
1 Botella, 15ml
10. **Cubierta de placa:** 1 unidad
11. **Instrucciones de uso:**

1

Ensayo para 192 determinaciones

Referencia B192-01M

1. **Microplaca recubierta con antígeno de *C. pneumoniae*:** 96 pocillos desarmables (8x12) recubiertos con antígeno de *C. pneumoniae*, empacado en una bolsa de aluminio que contiene una tarjeta con gel de sílice.
2 Placas
2. **Solución de lavado concentrada (20x):** Solución de PBS-Tween.
2 Botellas, 100ml
3. **Diluyente de Suero-IgM (rojo):** Anti IgG humana en solución tampón, lista para usar. Contiene menos de 0.05% proclin como conservante.
2 Botellas, 60ml
4. **Diluyente del Conjugado (verde):** Una solución tamponada lista para usar. Contiene menos de 0.05% proclin como conservante.
1 Botella, 80ml
5. **Control negativo:** Suero humano negativo a IgM de *C. pneumoniae*, solución lista para usar. Contiene menos de 0.05% Proclin y menos de 0.1% azida sódica como conservantes.
1 frasco, 2.4ml
6. **Control positivo:** Suero humano positivo a IgM de *C. pneumoniae*, solución lista para usar. Contiene menos de 0.05% proclin y menos de 0.1% azida sódica como conservantes.
1 frasco, 1.25ml
7. **Conjugado-HRP concentrado (300X):** Anticuerpo anti IgM humano (específico de cadena μ) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Contiene menos de 0.05% proclin como conservante.
1 frasco, 0.2ml
8. **Substrato-TMB:** Solución lista para usar. Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina como cromógeno y peroxidasa como sustrato. 1 Botella, 24ml

9. **Solución de Parada (Stop Solution):**
Solución lista para usar. Contiene H₂SO₄ 1M. 1 Botella, 30ml
10. **Cubierta de placa:** 2 unidades
11. **Instrucciones de uso:** 1
-

Materiales Requeridos que no se proporcionan

1. Tubos de ensayo limpios para la dilución de los sueros de los pacientes.
 2. Frascos de plástico desechables para la dilución del conjugado-HRP concentrado.
 3. Micropipetas ajustables o multicanal (rangos de 5-50, 50-200, 200-1000µl) y puntas desechables.
 4. Vaso de precipitados (1 litro).
 5. Probeta (50ml).
 6. Piseta (frasco lavador) de plástico.
 7. Papel absorbente.
 8. Vórtex.
 9. Baño a 37°C con tapa, o cámara de incubación húmeda a 37°C.
 10. Lector de placas para ELISA con filtro para 450nm.
 11. Agua destilada o doblemente desionizada.
-

Precauciones

Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro

1. Este kit contiene suero humano que ha sido analizado por técnicas aprobadas por la FDA y CE, y se ha encontrado que es negativo para AgsHB, y para anticuerpos frente a VHC y VIH 1 y 2. Sin embargo, ya que no se conoce ningún método capaz de ofrecer una garantía absoluta de que productos derivados de sangre humana no transmiten infección, todos los componentes de sangre humana que se proporcionan en el kit deben manipularse como muestras de suero o sangre potencialmente infecciosas, de acuerdo con las recomendaciones publicadas en el manual CDC/NIH de "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en laboratorios Microbiológicos y Biomédicos), 1988.
 2. El substrato-TMB es un material irritante para la piel y membranas mucosas. Evite el contacto directo.
 3. Todos los componentes del kit han sido calibrados y probados por lote. No se recomienda usar soluciones de distintos lotes puesto que se pueden afectar los resultados.
 4. El ácido sulfúrico diluido (H₂SO₄ 1M) es un agente irritante de la piel y los ojos. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua corriente y consultar un médico.
-

Conservación y vida media de los reactivos

1. Todos los materiales que se proporcionan deben almacenarse entre 2-8°C. Los reactivos en los frascos cerrados son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La exposición de los componentes del kit recién abiertos a temperatura ambiente durante unas pocas horas no produce ningún daño. **NO CONGELAR LOS REACTIVOS.**
2. El kit caduca a los 90 días de haber sido abierto.
3. Las tiras de la placa no utilizadas, deben guardarse selladas en su bolsa de aluminio con el paquete de gel de sílice, enrollando la bolsa a todo lo largo de la apertura y sellando con cinta adhesiva a todo lo largo.
4. Es posible que haya formación de cristales en la solución de lavado concentrada (20X) durante su almacenamiento en frío; ésto es perfectamente normal. Redisuelva los cristales calentando la solución a 37°C antes de diluir. Una vez diluida, la solución puede almacenarse entre 2-8°C hasta 21 días.

Extracción del suero

El suero deberá prepararse a partir de muestras recogidas asépticamente utilizando las técnicas estándar. No deben utilizarse las muestras que hayan sido inactivadas por calor. El uso de suero lipémico, turbio o contaminado no es recomendado. Partículas o precipitados en el suero pueden causar resultados erróneos. Estas muestras deberán clarificarse centrifugando o filtrando antes de someterlas al ensayo.

Almacenamiento de las muestras

Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 7 días (se recomienda agregar 0.1% de azida sódica). Si se requiere almacenamiento por largos periodos, las muestras deberán almacenarse a -20°C en alícuotas. Evite descongelar y congelar repetidamente.

Procedimiento del ensayo - Manual

Protocolo de automatización disponible bajo petición

A. Preparación de los reactivos

1. Permita que todos los reactivos y especímenes clínicos alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien las muestras y los controles positivo y negativo antes de usarlos.
2. Determine el número de muestras a probar. Además de las muestras, debe agregarse en cada prueba dos pocillos con Control Negativo y un pocillo con Control Positivo.
3. Saque la microplaca de su bolsa de aluminio cortando cerca del lado sellado. Deje el número de tiras requerido (de acuerdo con el número de muestras a probar) en el marco de la microplaca.
4. Diluya la solución de lavado concentrada 1/20 con agua destilada o doblemente desionizada. Por ejemplo, para preparar un litro de solución de lavado, añada 50ml de la solución de lavado concentrada a 950ml de agua destilada o doblemente desionizada.

B. Incubación de las muestras y controles

5. Diluya el suero de cada paciente 1/105 con el Diluyente de Suero proporcionado, de la siguiente manera: Añada 5µl de suero del paciente a 520µl de Diluyente de Suero.
6. **Dilución en dos pasos:** Diluya el suero de cada paciente 1/105 con el Diluyente de Suero proporcionado, de la siguiente manera: Añada 10µl del suero del paciente a 200µl de Diluyente del Suero (1/21), y después diluya agregando 25µl de la dilución 1/21 a 100µl de Diluyente del suero.
7. **Nota:** El diluyente del suero contiene anti IgG humana, para la remoción de anticuerpos IgG de suero humano.
8. Añada en cada pocillo 50µl del Control Positivo, del Control Negativo y del suero diluido 1/105. **El Control Negativo debe añadirse en dos pocillos separados.**
9. Cubra las tiras con la cubierta de placa e incube 1h a 37°C en una cámara húmeda.
10. Descarte el líquido contenido en los pocillos.
11. **Lavado:** Llene completamente cada pocillo con solución de lavado y descarte el líquido; repita este paso dos veces más, para un total de tres veces.
12. Seque el marco y las tiras golpeando suavemente sobre papel absorbente.

C. Incubación con el Conjugado

13. El Conjugado-HRP concentrado debe diluirse inmediatamente antes de usarse. Diluir el concentrado de conjugado anti-IgM humano-HRP 1/300 con el Diluyente de conjugado. Por ejemplo, para dos tiras prepare un mínimo de 3ml de conjugado-HRP diluido (10µl de Conjugado-HRP concentrado mezclado con 3ml de Diluyente del Conjugado).
14. Añada 50µl del conjugado diluido en cada pocillo.
15. Cubra las tiras con la cubierta de placa e incube 1h a 37°C en una cámara húmeda.
16. Descarte el líquido contenido en los pocillos y lave como se describe en los pasos 9 y 10.

D. Incubación con el Substrato-TMB

17. Administre 100µl del Substrato-TMB en cada pocillo, cubra las tiras con la cubierta de placa e incube a temperatura ambiente por **15 minutos**.
18. Pare la reacción agregando a cada pocillo 100µl de solución de Parada (H₂SO₄ 1M).

E. Determinación de los Resultados

19. Determine la absorbancia a 450nm y guarde los resultados. La lectura no debe efectuarse después de 30 minutos de haber parado la reacción cromogénica.
 20. **Nota:** Toda burbuja de aire debe ser eliminada antes de la lectura. La base de la placa de ELISA debe limpiarse con cuidado.
-

Validación del Ensayo

Para que el ensayo sea válido debe cumplir con los siguientes criterios. En caso de no cumplirse estos criterios, el ensayo debe considerarse inválido y deberá repetirse.

1. **Control Positivo:** La absorbancia deberá ser ≥ 0.8 a 450nm.
2. **Control Negativo:** El promedio de absorbancia del Control Negativo (CN) deberá ser de $0.1 < CN \leq 0.4$ a 450nm.

Cálculo del valor del punto de corte (VPC) y del índice del punto de corte (IPC)

El valor del punto de corte se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula: $VPC = CN \times 2$

CN = Absorbancia promedio del Control Negativo a 450nm ensayado en duplicado.

Para normalizar el resultado obtenido en diferentes ensayos, el índice del punto de corte es calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IPC = \frac{\text{Absorbancia a 450nm del suero probado}}{VPC}$$

Interpretación del Resultados

Tabla 1: Correlación entre la absorbancia a 450nm y la presencia de anticuerpos IgM frente a *C. pneumoniae*

Absorbancia (450nm)	IPC	Resultado	Interpretación del diagnóstico
$O.D < 1.4 \times VPC$	< 1.4	Negativo Anticuerpos IgM no detectados	No hay indicación de infección actual por causa de <i>C. pneumoniae</i>
$1.4 \times VPC \leq O.D \leq 1.5 \times VPC$	1.4-1.5	Límite Nivel bajo de anticuerpos IgM	Indicativo de una posible exposición a <i>C. pneumoniae</i> Una segunda muestra deberá ser sometida a prueba después de 2-4 semanas ¹
$O.D > 1.5 \times VPC$	> 1.5	Positivo Niveles relevantes de anticuerpos IgM	Indicativo de infección de <i>C. pneumoniae</i> actual

1. En caso de resultado límite, una segunda muestra deberá ser recogida después de 2-4 semanas y ensayarse conjuntamente con la primera muestra. Si se obtiene nuevamente un nivel límite, la muestra deberá considerarse negativa.

Para obtener un perfil más completo de anticuerpos, IgM e IgA también deberán ser ensayados.

**Tabla 2: Interpretación de resultados combinados de anticuerpos IgG, IgA e IgM
Niveles de anticuerpos frente a *C.pneumoniae* Interpretación de Resultados**

IgM	IgG	IgA	
Negativo	Negativo	Negativo	No hay indicación de infección de <i>C.pneumoniae</i>
Positivo	Negativo o Positivo	Negativo o Positivo	Indicativo de infección actual
Negativo	Positivo	Negativo	Indicativo de infección actual o pasada
Negativo	Positivo o Negativo	Positivo	Indicativo de infección actual o crónica

Limitaciones del Ensayo

1. No debe utilizarse únicamente un solo ensayo serológico para realizar un diagnóstico final. Deben tenerse en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.
2. Las muestras extraídas al inicio de una infección primaria, pueden contener cantidades no detectables de anticuerpos. Si se sospecha de una infección por Chlamydia, deberá obtenerse una segunda muestra transcurridas 2-4 semanas, y ensayarse en paralelo con la muestra original.

Características del Ensayo

Tabla 3: Comparación del ensayo SeroCP^{MR} IgM con un ensayo de microinmunofluorescencia (MIF) de la misma procedencia

El kit SeroCPTM IgM fue evaluado en comparación con Chlamydia IgM SeroFIATM (Savyon Diagnostics Ltd. Cat. No. 512-01).

El estudio fue efectuado en dos centros médicos usando 113 muestras de suero de individuos sintomáticos (33) y niños sanos (80).

SeroFIATM / SeroCPTM	Positivos	Negativos	Total
Positivos	30	4	34
Negativos	3	76	79
Total	33	80	113

Sensibilidad: $30/33 \times 100 = 91\%$
Especificidad: $76/80 \times 100 = 95\%$
Concordancia entre ambos métodos: $106/113 \times 100 = 94\%$

Precisión

En un mismo ensayo

Muestras	No. de repeticiones	Promedio	CV%
Positivas	10	1.469	2.3
Negativas	10	0.236	4.7

Entre ensayos

Muestras	No. de repeticiones	Promedio	CV%
Positivas	10	0.605	5.4
Negativas	10	0.163	6.0

Bibliography

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR)

- Clin Microbiol REV; 8:451-461.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. *Ann. Intern. Med.* 116: 273-278.
 3. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984). Chlamydia pneumoniae and its serodiagnosis in infants. *J. Infect. Dis.* 149: 598-604.
 4. Campbell, L.A. (1993). PCR detection of Chlamydia pneumoniae In *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
 5. Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic evolution of serum chlamydia antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. *Fertility and Sterility.* 62: No. 3.
 6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Eckman, M.R., Makela, P.H. and Valtonen, V. (1988). Serological Evidence of an Association of a Novel Chlamydia TWAR with Chronic Coronary Heart Disease and Acute Myocardial Infarction. *Lancet.* 2: 983-986.
 7. Grayston, J.T., Cambell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: Chlamydia pneumoniae Strain TWAR. *J. Inf. Dis.* 161: 618-625.
 8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Mannin, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic Chlamydia pneumoniae Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. *Ann. of Int. Med.* 116: 273-278.



Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL
Tel.: +(972).8.8562920
Fax: +(972).8.8523176
E-mail: support@savyondiagnosics.com



**European Authorized
Representative:
MedNet EC-REP GmbH**
Borkstrasse 10,
48163 Muenster, Germany

Symbols for IVD components and Reagents	
	Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Manufacturer
	Store at 2°C – 8°C
	Expiry Date
	Warning
	Danger
	Contains Sufficient for 96 tests
	Consult Instructions for Use
	CE mark
	EU Authorized representative
	Batch Number