

VIRUS DE LA RUBÉOLA IgG

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la detección cualitativa de anticuerpos de clase IgG contra el virus de la rubéola (VR-IgG) en suero o plasma humano.

Resumen:

El virus de la rubéola pertenece a la familia de los virus de la rubéola, de la familia de los virus del herpes. El virus de la rubéola se transmite a través del tracto respiratorio con una latencia de aproximadamente 2 a 3 semanas. Después de la proliferación del virus, entra en el torrente sanguíneo y causa viremia. Los síntomas clínicos de la rubéola son similares a los de un resfriado común. Primero, hay síntomas generales de sensibilidad superior e inflamación de los ganglios linfáticos detrás de las orejas y debajo de la almohada. Luego, hay manchas rojas y pápulas latentes en la cara que se extienden rápidamente por todo el cuerpo. La infección por rubéola durante el embarazo puede causar muerte fetal o síndrome de rubéola congénita (SRC).

Después de la infección por el virus de la rubéola, el anticuerpo IgM específico aparece temprano, aumenta rápidamente y dura poco tiempo. Alcanza el nivel más alto dos semanas después de la aparición del sarpullido y dura de 1 a 2 meses. La detección del anticuerpo IgM de la rubéola se puede utilizar para el diagnóstico de la infección primaria por rubéola. El anticuerpo IgG específico de la rubéola aparece aproximadamente una semana después de la producción del anticuerpo IgM de la rubéola. El nivel de IgG alcanza un pico después de 4 a 6 semanas de infección y luego disminuye gradualmente hasta cierto nivel y dura de por vida. Es un indicador de observación a largo plazo de la infección. La detección del anticuerpo IgG de la rubéola se puede utilizar para diagnosticar si hay una infección previa por rubéola y tomar las medidas adecuadas para las personas susceptibles, como la vacunación contra la rubéola. La detección del anticuerpo IgG del virus de la rubéola también se puede utilizar para monitorizar la reactividad de los anticuerpos después de la inmunización con la vacuna contra la rubéola.

Principio:

Esta prueba detecta el anticuerpo IgG del virus de la rubéola (VR-IgG) en muestras de suero o plasma humano. Las tiras de micropocillos de poliestireno están prerrecubiertas con el antígeno del virus de la rubéola. Después de añadir primero las muestras de suero o plasma que se van a examinar, los anticuerpos específicos correspondientes (VR-IgG-Ab y algunos IgM-Ab) presentes en las muestras del paciente se unen a los antígenos en la fase sólida, y otros componentes no unidos se eliminarán mediante lavado. En el segundo paso, el anti-IgG humano conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) reaccionará específicamente solo con los anticuerpos IgG del VR. Después de lavar para eliminar el conjugado de HRP no unido, se añaden soluciones de cromógeno a los pocillos, en presencia del inmunocomplejo (VR Ag) (VR-IgG) -(anti-IgG humana-HRP) para el desarrollo del color, y la HRP conectada al complejo cataliza la reacción del desarrollador de color para generar una sustancia azul, se agrega 50 µL de solución de parada y la sustancia cambia a color amarillo. Se leerá el valor de absorbancia con un lector de microplacas y se juzgará el resultado.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12, 96 pocillos, recubierta previamente con anticuerpos del virus de la rubéola.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 12 ml de HRP. Listo para usar.
- Control Negativo, 1 vial de 1 ml, listo para usar.
- Control Positivo, 1 vial de 1 ml, listo para usar.
- Diluyente de muestra, 1 vial de 12 ml, listo para usar.
- Cromógeno A, 1 vial de 6 ml cada uno, listo para usar.
- Cromógeno B, 1 vial de 6 ml cada uno, listo para usar.
- Solución de parada, 1 vial de 6 ml.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial de 50 ml (concentrado 20X), Contiene fosfato, NaCl y Tween-20.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 630 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas con una precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

Precauciones y Advertencias:

- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos 5 veces por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado. Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo.
- Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua.
- Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- La humedad atmosférica en placas frías reduce significativamente su vida útil.
- Después de obtener el número requerido de tiras, la placa debe colocarse en la bolsa de plástico con cierre con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo.
- Usar el pozo en blanco para corregir el cero punto de lectura si se utiliza un lector de longitud de onda única. Si los lectores de doble longitud de onda con 450nm y 630nm son usados, no hay necesidad de corregir el punto cero.

Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C
- Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regrese a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los calibradores no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

Recolección y Preparación de Muestras:

- Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas.
- Las muestras de suero pueden analizarse mediante este procedimiento, separe suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.

- Las muestras de plasma se recolectan en tubos con anticoagulante adecuado (EDTA, Heparina o citrato de sodio), otros anticoagulantes pueden dar falsos resultados. Separe plasma del coágulo tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
- Las muestras cubiertas se pueden almacenar hasta 7 días a 2-8°C.
- Las muestras conservadas durante más tiempo se pueden congelar a -20 °C y evitar la congelación de fusión repetida, mezclar después de descongelar.
- Centrifugar muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba que debe ser eliminado por centrifugación. Asegúrese de que la formación completa del coágulo en las muestras de suero ha tenido lugar antes de la centrifugación.

Solución de Lavado (Dilución 20X):

Diluya 50 ml de Solución de Lavado Concentrada en 950 ml de agua desionizada, para un volumen final de 1000 ml. Estable por 2 meses a temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada control y muestra a realizar. Todos los controles deben establecer duplicado.
- Agregue 100 µL de diluyente y 10 µL de muestras en sus respectivos pocillos
- Agregue 100 µL de control positivo y de control negativo en sus respectivos pocillos sin diluir.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar deje un pocillo vacío para el blanco.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 30 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µL de solución de lavado, 30 a 60 segundos por cada lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.
- Agregue 100 µL de conjugado enzimático (no añadir al pocillo del blanco). Mezclar suavemente agitando.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 30 minutos.
- Repetir el paso de lavado (5 veces).
- Dispense 50 µL de cromógeno A en cada pocillo (incluyendo el pocillo del blanco).
- Dispense 50 µL de cromógeno B en cada pocillo (incluyendo el pocillo del blanco).
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 10 minutos en la oscuridad.
- Agregue 50 µL de solución de parada a cada pocillo.
- Agite de 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pozo dentro de los primeros 30 minutos a 450nm (usando 620 a 630nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.

Interpretación de Resultados:

Método colorimétrico:

Cálculo del valor de corte:

COV = 0,10 + la DO media de los controles negativos (si la absorbancia de los controles negativos está por debajo de 0,05, calcúlela como 0,05. Si la absorbancia de los controles negativos está por encima de 0,05, calcúlela como su valor original).

El valor del blanco que contiene solo cromógenos y solución de parada debe ser <0.080.

El valor del control positivo debe ser >0.300 con los filtros 450/630 nm o en 450 nm después del blanco.

El valor del control negativo debe ser <0.080 con los filtros 450/630 nm o en 450 nm después del blanco.

Resultados positivos: Valor de DO de la muestra \geq C.O.

Las muestras con una absorbancia igual o superior a la C.O. se consideran inicialmente reactivas, representan anticuerpos IgG-VR detectados en la muestra. Un resultado positivo en anticuerpos IgG-VR es un indicador importante de una infección pasada por VR.

Resultados negativos: D.O. de la muestra < C.O.

Las muestras con una absorbancia inferior al C.O. son negativas para este ensayo, lo que indica que no se ha detectado VR.

Limitaciones:

- Los resultados positivos deben confirmarse con otro método disponible e interpretarse junto con la información clínica del paciente.
- El reactivo es cualitativo y no puede utilizarse como reactivo cuantitativo.
- Este reactivo se utiliza únicamente para la detección de muestras de suero/plasma humano.
- La IgG específica para el virus de la rubéola es negativa, lo cual puede ocurrir en la etapa temprana de la infección aguda. Los resultados negativos deben justificarse junto con los síntomas clínicos o el contacto con el patógeno, así como otros métodos de diagnóstico y pruebas.

Características de Rendimiento:

Especificidad: detección de IgG-VR con reactivo RjL y otro reactivo de control en detección paralela de 178 casos de suero humano normal; la especificidad es del 100 %.

Sensibilidad: El suero de casos clínicos se detectó mediante el reactivo RjL y el otro reactivo de control en paralelo. La sensibilidad del grupo experimental RjL fue del 99.7% y la del control fue del 99.8%.

Referencias:

1. Jin Qi, et al. Medical Molecular Virology [M]. Beijing: Science Press, 2001:485-496.
2. Janet Chantler, Jerry S.Wolinsky, and Auvrey Tingle.Chapter31: Rubella virus: The Viruses and Their Replication[A].Fields Virology[M], Fourth Edition.
- 3.Xu aiqiang, song Yanyan, Chen Shiyu. Research progress of rubella epidemic and rubella immune prevention in China [J]. Preventive medical literature information, 1999, (1): 68-71.
- 4.M Schmidt, et al. Detection of Rubella Virus-Specific Immunoglobulin M Antibodies with a Baculovirus-Expressed E1 Protein[J].Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Mar. 1996, p.216-218.
- 5.Andreas Giessauf, Thomas Letschka, Gernot Walder.A synthetic peptide ELISA for the screening of rubella virus neutralizing antibodies in order to ascertain immunity[J]. Journal of Immunological Methods, 2004 (287) 1-11.
6. Patricia Cordoba, Alejandra Lanoel, Sergio Grutaduria and Marta Zapata.Evaluation of Antibodies against a Rubella Virus Neutralizing Domain for Determination of Immune Status[J].Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Nov. 2000, p.964-966.

