

VIRUS DE LA RUBÉOLA IgM

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la detección cualitativa de anticuerpos de clase IgM contra el virus de la rubéola (VR-IgM) 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 IgM del virus de la rubéola (VR-IgM) en muestras de suero o plasma humano. Las tiras de micropocillos de poliestireno están prerrecubiertas con anticuerpos dirigidos a las proteínas de inmunoglobulina M humana (anti-cadena). Después de añadir primero las muestras de suero o plasma que se van a examinar, se pueden capturar los anticuerpos IgM de la muestra y otros componentes no unidos (incluidos los anticuerpos IgG específicos) se eliminarán mediante lavado. En el segundo paso, los antígenos conjugados con HRP (peroxidasa de rábano picante) reaccionarán específicamente solo con anticuerpos IgM de VR. Tras el lavado para eliminar el conjugado de HRP no unido, se añaden soluciones cromógenas a los pocillos, en presencia del inmunocomplejo (anti- μ)-(VR-IgM)-(VR Ag-HRP) para el revelado de color, y la HRP conectada al complejo cataliza la reacción del desarrollador de color para generar una sustancia azul, se agrega 50 μ l 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 antígeno 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, 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 precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua desmineralizada.

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 regréselo 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 estandarizados 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.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener muestras de controles en los niveles bajo, normal y rango elevado para monitorear el rendimiento de la prueba. Debe haber controles tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de controles recomendados para este ensayo es utilizar un control por separado y probarlos junto las muestras dentro de la misma corrida. El resultado es válido si los valores de control están dentro de la concentración rangos impresos en las etiquetas.

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 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 μ l de diluyente y 10 μ l de muestras en sus respectivos pocillos
- Agregue 100 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l de cromógeno A en cada pocillo (incluyendo el pocillo del blanco).
- Dispense 50 μ l 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 15 minutos en la oscuridad.
- Agregue 50 μ l 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 = $0,10 + \text{la DO media de los controles negativos}$ (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 IgM-VR detectados en la muestra. Un resultado positivo en anticuerpos IgM-VR es un indicador importante de una infección previa por VR.

Resultados negativos:

D.O. de la muestra < C.O. Las muestras con una absorbancia inferior a 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.
- Los anticuerpos pueden ser indetectables durante la etapa inicial de la enfermedad y en algunos individuos inmunodeprimidos. Por lo tanto, los resultados negativos obtenidos con la prueba ELISA VR-IgM solo indican que la muestra no contiene un nivel detectable de anticuerpos IgM VR y cualquier resultado negativo no debe considerarse como evidencia concluyente de que el individuo no está infectado con VR.

Características de Rendimiento:

Especificidad: detección de IgM-VR con reactivo R.J.L y el reactivo de control Diasorin de Italia en detección paralela de 752 casos de suero humano normal; la especificidad es del 100 %. Sensibilidad: El suero de 426 casos clínicos se detectó mediante el reactivo R.J.L y el reactivo Diasorin de Italia en paralelo. La sensibilidad del grupo experimental R.J.L fue del 99.1% y la del grupo control fue del 99.3%.

Referencias:

- 1.Fields Virology[M], Fourth Edition.
- 2.Preventive medicine literature information[J], 1999(5):68-71.
- 3.Journal of Immunological Methods[J], 2004(287):1-11.
- 4.Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology[J], 2000(7): 964-966.
- 5.J.Clin.Microbiol.33:270-274..

