

INTENCIÓN DE USO

El kit Rubeola IgM ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgM de Rubeola en suero o plasma humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La Rubeola es generalmente una enfermedad leve sin complicaciones. En poblaciones no vacunadas, la rubeola es principalmente una enfermedad de la niñez. Donde los niños se encuentran bien inmunizados, la infección se hace más evidente en adolescentes y adultos. La rubeola se propaga a través del contacto directo con secreciones nasales o de la garganta de sujetos infectados. Los síntomas generalmente son erupciones, fiebre leve, dolor en articulaciones, jaqueca, goteo nasal y enrojecimiento en los ojos. El periodo de incubación es de 12 a 23 días y en la mayoría de los casos, los síntomas aparecen entre los 16 y 18 días. Si se contagia dentro del primer trimestre de embarazo, la infección puede devenir en CRS (Síndrome de Rubeola Congénita). La infección durante el embarazo puede resultar en aborto, muerte del feto o nacimiento con condiciones tales como sordera, cataratas, defectos cardíacos, daño hepático y del bazo, y retraso mental. El CRS ocurre en un 25% de los nacimientos de mujeres infectadas en el primer trimestre. La presencia de anticuerpo IgG a Rubeola indica vacunación o infección previa. En pacientes con infección aguda, el alto incremento de anticuerpo IgG indica infección reciente. Los anticuerpos IgM a la Rubeola son detectados por ELISA en un 100% de los pacientes entre 11 y 25 días posteriores al inicio del exantema, en un 60-80% de pacientes entre los 15 y 25 días posteriores a la vacunación, y entre 90 y 97% de los infantes con CRS entre las 2 y 12 semanas posteriores al parto.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgM 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 hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM específico en la muestra.

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

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 almacenamiento 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. 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.

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 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

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de Rubeola IgM; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.9 Anticuerpo no detectado de Rubeola IgM por ELISA

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

>1.1 Anticuerpo detectado de Rubeola IgM por ELISA

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Para asegurar sensibilidad y especificidad en esta prueba IgM, el diluyente de la muestra provisto fue formulado para bloquear posibles interferencias de IgG y de Factor Reumatoide (RF). Puede observarse turbidez luego de diluir la muestra, lo que se debe al bloque del suero IgG y no ha demostrado interferencia en los resultados. Dicha turbidez puede ser removida mediante centrifugación.
2. En especímenes con un alto RF y gran presencia de anticuerpos autoinmunes, no puede asegurarse la eliminación de interferencias.
3. Las muestras lipémicas pueden causar resultados erróneos.

PERFORMANCE

1. Sensibilidad y Especificidad:

142 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 15 sueros resultaron positivos y 126 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 99%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Rubeola IgM ELISA		
	+	-	Total
Kit de Referencia ELISA	15	1	16
-	0	126	126
Total	15	127	142

2. Precisión:

Estudio Intra-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	16	1.43	0.074	5.17
2	16	0.92	0.57	6.20
3	16	0.11	0.006	5.83

Estudio Inter-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	10	1.45	0.143	9.86
2	10	0.95	0.112	11.78
3	10	0.10	0.012	12.00

REFERENCIAS

1. de Souza VA; Sumita LM; Otsubo ME; Takei K; Pannuti CS. Enzyme linked immunosorbent assay for rubella antibodies: a simple method of antigen production. A preliminary report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1995; 37(4):357-9.
2. Matter L; Germann D; Bally F; Schopfer K. Age-stratified seroprevalence of Rubella, mumps and rubella (MMR) virus infections in Switzerland after the introduction of MMR mass vaccination. Eur J Epidemiol 1997; 13(1):61-6.
3. M'uhlebach-Sponer M; Zbinden R; da Silva VA; Gnehm HE. Intrathecal rubella antibodies in an adolescent with Guillain-Barré syndrome after mumps-Rubella-rubella vaccination [letter]. Eur J Pediatr 1995; 154(2):166.
4. Johnson CE; Kumar ML; Whitwell JK; Staehle BO; Rome LP; Dinakar C; Hurni W; Nalin DR. Antibody persistence after primary Rubella-mumps-rubella vaccine and response to a second dose given at four to six vs. eleven to thirteen years. Pediatr Infect Dis J 1996; 15(8):687-92.
5. Matter L; Kogelschatz K; Germann D. Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations. J Infect Dis 1997; 175(4):749-55.