

# RUBELLA IgM

## Prueba ELISA para la detección de anticuerpos IgM Anti-virus de Rubéola en suero humano

### Presentación del estuche

<b>REF</b>	51108	96 determinaciones	Estuche completo
<b>IVD</b>			

### Uso esperado

La prueba ELISA RUBELLA IgM está destinada a la detección de anticuerpos clase IgM contra el virus de rubéola en suero humano.

La infección por Rubéola causa un exantema moderado, a menudo subclínico. Sin embargo, cuando se adquiere en útero, el virus de la Rubéola puede producir el Síndrome de Rubéola congénita, y causar el muero del feto, cataratas, malformaciones, sordera, y retardo mental. La presencia de anticuerpos IgM específicos anti-Rubéola en la mujer durante el primer trimestre del embarazo apoya fuertemente la presunción de infección congénita.

### Principio - EIA clásico -

La prueba HUMAN ELISA RUBELLA IgM está basada en la clásica técnica ELISA. Los micropocillos ELISA son recubiertos con antígenos de virus de Rubéola (VR-Ag) purificados. En la primera etapa de incubación, los anticuerpos anti-virus de Rubéola IgM (anti-VR-IgM-Ac) contenidos en la prueba o el control se fijan específicamente a los antígenos inmovilizados. El buffer de dilución contiene anti IgG humana para **prevenir interferencia por Factor Reumatoide y competencia de IgG específica presente en la muestra**. Al final de la incubación, los componentes excesivos son eliminados por lavado. En la segunda etapa de incubación, se añade un conjugado anti-IgM (anticuerpos anti-IgM-humana, marcados con peroxidasa) que se fija específicamente a los anticuerpos IgM. Se forman inmunocomplejos típicos. Después de eliminar el conjugado excesivo por lavado (segunda etapa de lavado) y añadir TMB/Substrato (etapa 3), se forma un color azul que se transforma a amarillo después de parar la reacción. La intensidad de este color es directamente proporcional a la concentración de anti-VR-IgM-Ac en la muestra.

La extinción de los controles y muestras se determina haciendo uso de un lector de micropocillos ELISA (HUMAREADER). Los resultados de los pacientes se obtienen por comparación con un valor de punto de corte (cut-off value).

### Reactivos y contenidos

<b>MIC</b>	12	<b>Micropocillos en portatiras</b> (Código RUB M) Tiras ( <b>desprendibles</b> ) de 8 micropocillos cada uno, recubiertas con antígeno de paperas (derivados cultivo celular)	
<b>NC</b>	2,5 ml	<b>Control RUBELLA IgM negativo</b> (tapa verde) listo para el uso, humano	
<b>PC</b>	2,5 ml	<b>Control RUBELLA IgM positivo</b> (tapa roja) listo para el uso, humano	
<b>DIL-M</b> 5111	100 ml	<b>Buffer de dilución IgM</b> (tapa azul) listo para el uso, <b>color verde</b> Buffer Fosfato NaCl Albúmina Anti-IgG humana (oveja)	pH 6,5 ± 0,2 10 mmol/l 8 g/l 10 g/l
<b>CON</b>	12 ml	<b>Conjugado Antígeno IgM</b> (tapa blanca) listo para el uso, <b>color rojo</b> Anticuerpos anti-IgM-humano, marcados con peroxidasa (conejo)	
<b>WS</b> 5102	50 ml	<b>Solución de lavado</b> (tapa blanca) Concentrado para aprox. 1000 ml Buffer TRIS NaCl	pH 7,2 ± 0,2 10 mmol/l 8 g/l
<b>SUB</b> 5103	15 ml	<b>Reactivo Substrato</b> (tapa negra) listo para el uso, sin color a azulado 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Peróxido de Hidrógeno	pH 3,7 ± 0,2 1,2 mmol/l 3 mmol/l
<b>STOP</b> 5104	15 ml	<b>Solución de parada</b> (tapa roja) Acido sulfúrico, listo para el uso	0,5 mol/l
	2	<b>Cintas adhesivas</b>	

**Preservativos:** Concentración total < 0,1%

### Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y calibradores del estuche deberían ser manipulados como posibles agentes infecciosos. Los calibradores han sido encontrado negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o calibradores deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

**STOP** irrita los ojos, la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

### Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de expiración señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Después de abierto los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver también „Nota“).

### MIC (Código RUB M)

- están envasadas en bolsas de aluminio selladas con un desecante
  - deben estar a temperatura ambiente antes de abrir
  - no utilizados: **devolver junto con el desecante** en las bolsas de aluminio y almacenar de 2...8°C.
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

### Preparación de Reactivos

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso deben siempre estar almacenados a 2...8°C.

### Notas especiales

Los reactivos de propósito general con los denominaciones **DIL-M** 5111, **WS** 5102, **SUB** 5103, **STOP** 5104 de diferentes lotes y pruebas son intercambiables entre estos lotes y pruebas. Para análisis **IgM** usar solamente Buffer de Dilución IgM **DIL-M** 5111.

Todos los demás reactivos son específicos para los lotes individuales y no deben ser intercambiados con otros lotes o otras pruebas. Ningún reactivo de otra procedencia debería utilizarse junto con los reactivos de este estuche.

### Solución de lavado de trabajo WASH

- Diluir 1 porción de **WS** 5102 con 20 porciones de agua desionizada fresca, por ejemplo: 50 ml **WS** 5102 + 1000 ml = 1050 ml.
- Estabilidad: **1 semana entre 2...8 °C**.

### Muestra

Suero

No usar muestras altamente lipémicas o hemolíticas.

Muestras pueden almacenarse hasta por 7 días de 2...8°C o por más largo tiempo a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez**. Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

### Procedimiento

**Seguir el procedimiento exactamente como se describe.**

#### Notas de uso

**U1:** No mezclar tapas de envases (riesgo de contaminación). No usar reactivos después de sus fechas de expiración.

**U2:** No usar reactivos que pueden ser contaminados (turbidez u olor).

**U3:** Notar el reparto de las muestras y de los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.

**U4:** **MIC** – colocar el número requerido firmemente en el portatiras.

**U5:** **Analizar los controles en duplicado. Pipetear los controles y las muestras en el fondo** de los micropocillos.

**U6:** **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos y obtener resultados reproducibles**. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 5 minutos para evitar diferencias en los tiempos. De lo contrario pipetear los controles en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir los controles.

**U7:** Remover burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.

**U8:** Incubar **[SUB]** en la oscuridad. **[SUB]** inicia y **[STOP]** termina la reacción enzimática.

**U9:** **[DIL-M]** – Turbidez, luego de la adición del suero, no interfiere con el resultado.

#### Procedimiento de lavado

**El procedimiento de lavado es crítico.** Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

**L1:** Remover las cintas adhesivas. Aspirar el contenido (en un envase con solución de Hipoclorito de Sodio al 5%), agregar **[WASH]**, aspirar después de aproximadamente 30 sec. y repetir el lavado.

**L2:** Si disponible, cebar lavadores automáticos. Lavar las tiras 4 ó 5 veces con **[WASH]**. Asegurarse que los pocillos son llenados completamente y aspirados después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

**L3:** Después del lavado, **remover el líquido remanente invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbante.**

#### Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.				
Diluir el suero del paciente 1+100 con <b>[DIL-M] 5111</b> , por ejemplo 10 µl de suero + 1 ml de <b>[DIL-M] 5111</b> y mezclar vigorosamente, ver U9.				
<b>Incubar las muestras diluidas antes del uso por lo menos por 5 min.</b>				
Las muestras diluidas se pueden almacenar hasta 24 horas entre 2...8°C.				
Los controles son listos para el uso.				
Etapa 1	Pocillo [µl]			
	A1 Blanco	B1/C1 [NC]	D1/E1 [PC]	F1... Muestra
[NC] en duplicado	--	100	--	--
[PC] en duplicado	--	--	100	--
Muestra diluida	--	--	--	100
Cubrir <b>[MIC]</b> con cintas adhesivas				
Incubar por 30 min. a 17...25°C				
Lavar 4 veces como se describe (ver L1 – L3)				
[WASH]	350	350	350	350
Etapa 2				
[CON]	--	100	100	100
Cubrir <b>[MIC]</b> con cintas adhesivas				
Incubar por 30 min. a 17...25°C				
Lavar 5 veces como se describe (ver L1 – L3)				
[WASH]	350	350	350	350
Etapa 3				
[SUB] 5103	100	100	100	100
Incubar por 15 min. a 17...25°C (ver U8)				
[STOP] 5104	100	100	100	100
Mezclar cuidadosamente				
Llevar a cero de absorbancia el instrumento lector ELISA (HUMAREADER) con el blanco de sustrato con el pocillo A1.				
Medir la absorbancia a <b>450 nm</b> lo más pronto posible o <b>dentro de 30 min.</b> después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si está disponible).				

#### Cálculos de valores de control y punto de corte (Cut-off)

Valores promedio de Absorbancia del **[NC]** en pocillos B1 y C1 (**MNC**) y del **[PC]** en pocillos D1 y E1 (**MPC**) se calculan de acuerdo a:

$$MNC = \frac{A_{450}(B1) + A_{450}(C1)}{2}; \quad MPC = \frac{A_{450}(D1) + A_{450}(E1)}{2}$$

El punto de corte o valor cut-off **COV** se calcula usando la fórmula:

$$COV = MNC + 0,2 \times MPC$$

La serie analítica puede considerarse válida si se cumple con los siguientes criterios:

1. **Blanco Substrato en pocillo A1 < 0,150**
2. **MNC ≤ 0,250**
3. **MPC ≥ 0,400**
4. **MPC : MNC ≥ 3**

#### Interpretación de resultados

**A<sub>450</sub> (paciente) ≥ COV + 15% : anti-VR-IgM-Ac-positivo**  
**A<sub>450</sub> (paciente) < COV - 15% : anti-VR-IgM-Ac-negativo**

Debido a variaciones fisiológicas y analíticas los resultados de los pacientes un 15% arriba o abajo del valor calculado como cut-off son equívocos. Es recomendable medir estas muestras en paralelo con una muestra fresca tomada de 7 a 14 días después cada una en. El cambio de la concentración específica de anticuerpos deberá ser evaluado, si es necesario, tomando en cuenta la concentración específica de IgG (HUMAN ELISA IgG), la anamnesis del paciente, así como los resultados de más exámenes.

Si los resultados son repetidamente reactivos o equívocos, las muestras pueden ser sometidas a un análisis de confirmación.

Mediante una reactivación de la producción de Rubéola IgM en pacientes con Mononucleosis Infecciosa pueden presentarse resultados positivos. Por esta razón, debería examinarse la posibilidad de una Mononucleosis Infecciosa antes de la interpretación de los resultados.

Es posible una interpretación visual de los resultados si no está disponible un lector ELISA:

- \* El blanco sustrato en pocillo A1 debería aparecer no coloreado.
- \* Una muestra puede considerarse positiva si el color del micropocillo es claramente más intenso que el color de los pocillos de **[NC]** B1/C1.

#### Características de la ejecución

Los datos de rendimiento típicos se encuentran en el Verification Report que está disponible en

[www.human.de/data/gb/vr/el-rubm.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/el-rubm.pdf) o  
[www.human-de.com/data/gb/vr/el-rubm.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/el-rubm.pdf)

#### Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la expiración aún después de abiertos. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación está directamente relacionada con el número de tomas del reactivo. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP\*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(\*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)

#### Referencias

1. Engvall, E., Perlmann, P., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-874 (1971)
2. Engvall, E., Perlmann, P., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes, *J. Immunol.* **109**, 129-135 (1972)
3. Remington, J.S., Klein, J.O., *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* Sanders, Philadelphia, London, Toronto (1976)
4. Bidwell, D.E. *et al.*, Enzyme-immunoassays for viral diseases. *J. Infect. Dis.* **136**, Supplement 274-278 (1977)
5. Volk, W.A. *Essentials of Medical Microbiology.* Second ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, San Jose, Toronto, 628-629 (1982).

EL-RUBM  
 INF 5110801 E  
 06-2004-14



0483

**Human**