

Determinación de la avidéz de los anticuerpos contra la rubeola (IgG)

Instrucciones del ensayo

Referencia	Anticuerpos contra	Clase Ig	Sustrato	Formato
El 2590-9601-1 G	Virus de la rubeola	IgG	Tiras de microplaca recubiertas de antígeno	96 x 01 (96)

Uso previsto: El presente equipo de ensayo sirve para la determinación de la avidéz de los anticuerpos de la clase de inmunoglobulina IgG contra virus de la rubeola en suero o plasma humanos.

Fundamentos

La diferenciación entre infecciones recientes y preexistentes constituye uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la serología. Hasta ahora, el método de diagnóstico más extendido era la determinación de los anticuerpos específicos de clase de inmunoglobulina IgM, los cuales generalmente solo aparecen durante la fase inicialmente. Sin embargo, la detección de estos anticuerpos suele ser poco fiable y problemática. Esto se debe a la interferencia de factores tales como la persistencia de la respuesta IgM, la producción demasiado débil o retardada de IgM, y la producción inespecífica de IgM gracias a la estimulación policlonal de las células B.

Durante los últimos años se ha consolidado la determinación adicional de la avidéz de los anticuerpos como un método para la identificación de infecciones primarias. La reacción inicial del sistema inmune ante una infección consiste en la producción anticuerpos de baja avidéz. A medida que la enfermedad avanza, se empieza a segregar IgG cada vez más exactamente adaptada a los antígenos, y la avidéz aumenta. Si la IgG de alta avidéz es detectable en el suero, se puede deducir que la infección se halla en un estadio avanzado.

Contenido del sistema de ensayo El 2590-9601-1 G:

Componente	Color	Formato	Símbolo
1. Equipo de ensayo ELISA Anti virus de rubeola (IgG) (referencia El 2590-9601 G)	---		
2. Control positivo HA con anticuerpos de alta avidez contra virus de rubeola (IgG, humana), listo para usar	rojo	1 x 1,3 ml	POS CONTROL HA
3. Control positivo LA con anticuerpos de baja avidez contra virus de rubeola (IgG, humana), listo para usar	azul	1 x 1,3 ml	POS CONTROL LA
3. Solución de urea para ELISA Anti virus de rubeola, lista para usar	amarillo	1 x 12 ml	UREA
4. Tampón fosfato listo para usar	azul claro	1 x 12 ml	PBS BUFFER
5. Instrucciones del ensayo	---	1 folleto	
LOT Designación del lote IVD Diagnóstico in vitro	CE 0197	 Temperatura de almacenamiento  Sin abrir, utilizable hasta	

Almacenamiento y estabilidad: Los reactivos deben almacenarse a una temperatura de entre +2 °C y +8 °C. ¡No congelar! Sin abrir, todos los componentes del equipo son estables hasta la fecha de caducidad indicada. Todos los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso, y deben haber alcanzado la temperatura ambiente (+18 °C a +25 °C).

Eliminación de desechos: Las muestras de pacientes, los calibradores, los controles y las tiras de microplaca incubadas deben manipularse como desechos infecciosos. Todos los reactivos deben desecharse conforme a las normativas legales.

Los cambios a la versión anterior se resaltan en gris.



Preparación y estabilidad de los reactivos

Nota: Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) aproximadamente 30 minutos antes de su uso. Una vez abiertos, los reactivos pueden conservarse hasta la fecha de caducidad indicada, siempre y cuando se almacenen a una temperatura de +2 °C a +8 °C y se protejan contra cualquier contaminación, si no se indica expresamente otra cosa en el siguiente texto.

- **Controles:** Listos para usar. Los controles deben mezclarse bien antes de su uso.
- **Solución de urea:** Lista para usar. La solución de urea contenida en este equipo de ensayo debe utilizarse exclusivamente para la determinación de la avidéz de anticuerpos contra virus de rubeola.
- **Tampón fosfato:** Listo para usar.

Advertencia: Mediante inmunoensayos enzimáticos o inmunofluorescencia indirecta no se han detectado HBsAg ni anticuerpos contra VHC, VIH-1 y VIH-2 ni en los controles ni en los calibradores. Sin embargo, todos los componentes del ensayo deberán ser tratados como potencialmente infecciosos y en consecuencia manipulados con cuidado. Algunos de los reactivos contienen además el agente tóxico azida de sodio. Evite el contacto con la piel.

Preparación y estabilidad de las muestras de los pacientes

Muestras: Suero humano así como plasma con EDTA, heparina o citrato.

Estabilidad: Por regla general, las muestras de pacientes a analizar pueden conservarse hasta 14 días a una temperatura de entre +2 °C y +8 °C. Las muestras diluidas se deben incubar el mismo día que se preparan.

Dilución de muestras: Las **muestras de pacientes** a analizar se diluyen con tampón de muestra en la proporción **1:101**.

Ejemplo: añada 10 µl de muestra a 1,0 ml de tampón de muestra y mezcle bien con un vórtex. No es conveniente mezclar con la pipeta de muestra.

Nota: Los controles están listos para usar, no se deben diluir.



Incubación

Incubación de muestras: (1^{er} paso)

Conforme al esquema de pipeteado, agregar como valor doble a cada pocillo de reactivo de dos tiras de microplaca distintas 100 µl de los controles o de muestras de pacientes diluidas. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (+18 °C a +25 °C).

Lavado:

Manual: Vaciar los pocillos de reactivo y a continuación lavarlos **1 vez** con 300 µl de tampón de lavado diluido listo para usar.

Automático: Vaciar los pocillos de reactivo y a continuación lavarlos **1 vez** con 450 µl de tampón de lavado diluido listo para usar (ajuste del programa: p. ej. TECAN Columbus Washer «Overflow Modus»).

Dejar actuar el tampón de lavado en cada pocillo de reactivo entre 30 y 60 segundos por cada ciclo de lavado, y a continuación aspirar o vaciar. Tras el proceso de lavado, tanto en la ejecución manual como en la automática, sacudir enérgicamente la microplaca con las aberturas hacia abajo sobre papel absorbente para eliminar por completo los restos de tampón de lavado.

Las posiciones libres dentro de la tira de microplaca deben ocuparse con pocillos vacíos con el mismo formato de placa que el del parámetro a analizar.

Incubación con urea: (2^{er} paso)

Añadir con la pipeta 200 µl de la solución de urea en cada pocillo de reactivo de la primera tira de microplaca, así como 200 µl de PBS en cada pocillo de reactivo de la segunda tira de microplaca. Incubar durante **10 minutos** a temperatura ambiente (+18 °C a +25 °C).

Lavado:

Vaciar los pocillos. Lavar de la manera anteriormente descrita, pero **3 veces**, con tampón de lavado diluido listo para usar. Dejar actuar durante un mínimo de 30-60 segundos por cada ciclo de lavado.

Atención: Los restos de líquido (>10 µl) que permanezcan en los pocillos de reactivo tras el proceso de lavado pueden influir en la conversión del sustrato y dar lugar a valores de extinción falsamente bajos.

Un lavado insuficiente (p. ej. menos de 3 ciclos de lavado, volumen insuficiente de tampón de lavado o tiempos de acción demasiado cortos) puede dar lugar a valores de extinción falsamente elevados.

Incubación del conjugado: (3^{er} paso)

Añadir 100 µl de solución de conjugado enzimático (IgG antihumana marcada con peroxidasa) en cada pocillo de reactivo. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (+18 °C a +25 °C).

Lavado:

Vaciar los pocillos. Lavar de la manera anteriormente descrita, pero 3 veces, con tampón de lavado diluido listo para usar. Dejar actuar durante un mínimo de 30-60 segundos por cada ciclo de lavado.

Incubación del sustrato: (4^{er} paso)

Añadir 100 µl de la solución de cromógeno/sustrato en cada pocillo de reactivo. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente (+18 °C a +25 °C) (proteger de la exposición directa a la luz solar).

Parada:

Añadir 100 µl de la solución de parada en cada pocillo, en el mismo orden y a la misma velocidad con los que se agregó previamente la solución de cromógeno/sustrato.

Medición:

La **medición fotométrica** de la intensidad del color debe realizarse a una longitud de onda de medición de 450 nm y una longitud de onda de referencia de entre 620 nm y 650 nm, **dentro de los 30 primeros minutos después de añadir la solución de parada**. Antes de realizar la medición, agitar ligeramente la microplaca para asegurar la distribución homogénea de la solución colorante.



Esquema de pipeteado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pos HA	pos HA	P 7	P 7	P 15	P 15						
B	pos LA	pos LA	P 8	P 8	P 16	P 16						
C	P 1	P 1	P 9	P 9	P 17	P 17						
D	P 2	P 2	P 10	P 10	P 18	P 18						
E	P 3	P 3	P 11	P 11								
F	P 4	P 4	P 12	P 12								
G	P 5	P 5	P 13	P 13								
H	P 6	P 6	P 14	P 14								

El esquema de pipeteado especificado es un ejemplo de análisis de 18 muestras de pacientes (P 1 a P 18).

Los controles (pos HA y pos LA) y las muestras de los pacientes se utilizan en una determinación duplicada en distintas tiras de microplaca. Los pocillos de reactivo de las tiras de microplaca 1, 3, 5, etc. se tratan con solución de urea tras la incubación de las muestras, mientras que los de las tiras de microplaca 2, 4, 6, etc. se tratan con PBS.

Los pocillos pueden ser desprendidos individualmente de cada tira de microplaca: Esto permite cuadrar el número de sustratos usados para el ensayo con el número de muestras a examinar, y evitar así el desperdicio de reactivos.

Los dos controles positivos con anticuerpos de alta avidéz y anticuerpos de baja avidéz sirven como controles internos para establecer la fiabilidad del proceso de ensayo.

Interpretación de los resultados

La presencia de anticuerpos de baja avidéz en una muestra de paciente queda demostrada si la extinción medida en el ELISA se reduce considerablemente tras el tratamiento con urea. Para una interpretación objetiva, a partir de los valores medidos con y sin tratamiento con urea se calcula el índice de avidéz relativa (IAR) y se expresa en porcentaje.

$$\frac{\text{D.O. de la muestra tratada con urea} \times 100}{\text{D.O. de la muestra sin tratamiento con urea}} = \text{Índice de avidéz relativa (IAR) en \%}$$

El límite superior del rango de anticuerpos de baja avidéz (punto de corte) recomendado por EUROIMMUN es del 40% IAR. Los valores inferiores al punto de corte especificado son indicativos de anticuerpos de baja avidéz, los valores entre 40% y 60% IAR se consideran como resultado dudoso y valores por encima del 60% como indicativo de anticuerpos de alta avidéz. Si el resultado se clasifica como dudoso, se recomienda realizar una nueva toma de muestras al cabo de como mínimo una semana y repetir el ensayo junto con la primera muestra.

IAR < 40%:	indicativo de anticuerpos de baja avidéz
IAR 40% - 60%:	rango dudoso
IAR > 60%:	indicativo de anticuerpos de alta avidéz

Sólo se pueden obtener resultados fiables en el cálculo de la avidéz de los anticuerpos IgG si la muestra del paciente contiene una concentración de anticuerpos específicos significativa desde el punto de vista diagnóstico.

Generalmente, la determinación del índice de avidéz relativo no es útil en muestras que tienen una D.O. inferior a 0,140 después de la incubación sin tratamiento con urea.



Para el diagnóstico debe tenerse siempre en cuenta, además del resultado serológico, el cuadro clínico del paciente.

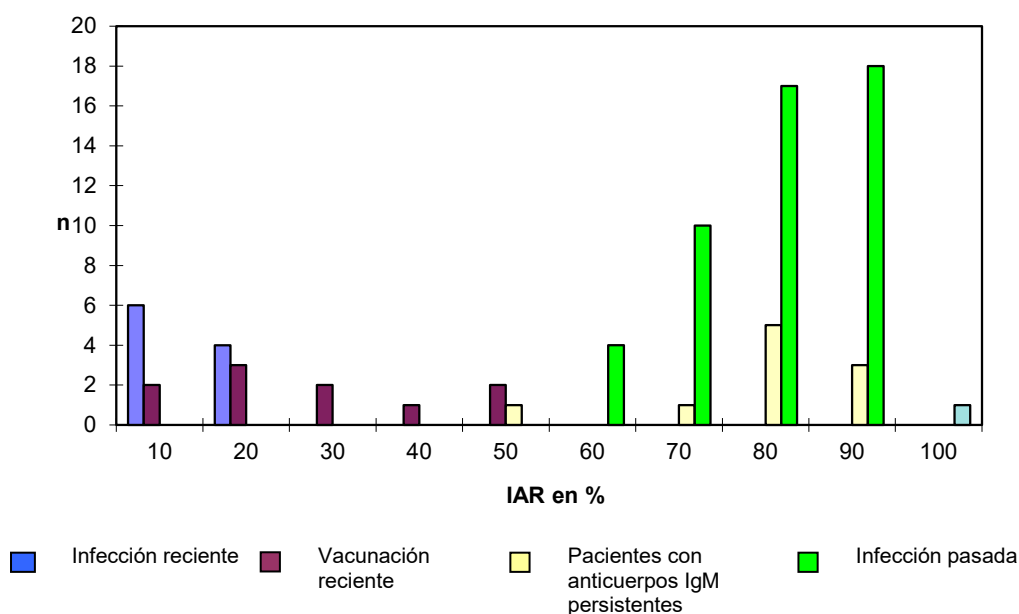
Atención:

En algunos pacientes con infecciones agudas pueden encontrarse ya títulos muy elevados de anticuerpos específicos de la clase IgG. Pese a que las poblaciones de anticuerpos IgG específicas pueden ser tanto de alta avidez como de baja avidez debido a los diferentes grados de maduración, los epítopos antigénicos vacantes son ocupados predominantemente por anticuerpos de alta avidez en muestras de título alto. En este caso, la determinación de la avidez de la totalidad de la población de anticuerpos IgG específicos puede arrojar valores IAR falsamente elevados.

Se han encontrado valores IAR falsamente elevados en algunos casos de infecciones agudas, cuando los valores de extinción de la medición de IgG sin tratamiento con urea fueron superiores a 1,200. Para muestras con valores de extinción > 1,200 se recomienda repetir la determinación de la avidez a una dilución mayor de la muestra (p.ej. 1:401). Si se determina una baja avidez de los anticuerpos IgG ya con valores de extinción superiores a 1,200, no es necesario hacer más pruebas.

Significado clínico

1. En un estudio propio, los 10 sueros de pacientes con una infección reciente (IAR 5% a 18%, promedio 9,0%) así como de 10 donantes de sangre con una vacuna reciente (IAR 6% a 43%, promedio 22,9%) arrojaron un índice de avidez relativo por debajo del 40%. En cada uno de los 10 pacientes con anticuerpos IgM persistentes (48% a 83%, promedio 73,6%) y en cada uno de los 50 pacientes con una enfermedad pasada tiempo atrás (55% a 95%, promedio 75,4%), el IAR se situó claramente por encima.



2. En un estudio externo del Departamento de Microbiología Médica y Enfermedades Infecciosas, Universidad de Manitoba, Winnipeg y del Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá, se probó el ELISA de EUROIMMUN para la determinación de la avidez de anticuerpos contra rubeola junto con otros 4 ensayos comerciales, en comparación con un ensayo de referencia interno de eficacia probada. Se utilizó un colectivo de n = 66 muestras de suero caracterizadas. En este estudio, el presente ensayo acredita una excelente correlación con la referencia y se revela como el mejor ELISA en la comparación entre todos los fabricantes comerciales.



El virus de la rubéola es un virus con envoltura de la familia Matonaviridae y consta de las proteínas estructurales C, E1 y E2, así como dos proteínas no estructurales (p90 y p150) [1-5]. Causa una enfermedad leve que, antes de la introducción de la vacuna, afectaba principalmente a los niños [3, 6, 7]. El virus de la rubéola solo aparece en humanos [1-3, 6] y se transmite principalmente por aerosoles [1-4, 6].

Hasta el 50% de las infecciones por rubéola son asintomáticas o subclínicas [1, 2, 8]. El tiempo de incubación es de 14 a 21 días [1, 3, 4, 7]. Los síntomas de la rubéola incluyen los ganglios linfáticos inflamados, principalmente detrás de las orejas y en el cuello, así como un sarpullido que comienza en la cara y se extiende por el resto del cuerpo y que normalmente dura 3 días [1-4, 8]. La infecciosidad empieza 7 días antes de la aparición del sarpullido y dura aproximadamente 10 días a partir de ese momento [1-4]. La artralgia y la artritis son las complicaciones más comunes de la rubéola y pueden durar hasta un mes [3, 4, 7, 8].

Una infección en una etapa temprana de embarazo puede causar un aborto, muerte al nacer y parto prematuro, así como el síndrome de rubéola congénita (SRC), que se caracteriza por defectos en el corazón (conducto arterioso abierto), los ojos (cataratas) y los oídos (pérdida auditiva neurosensorial) en los recién nacidos [2-7]. Pueden producirse muchas otras embriopatías [2, 6]. Una infección por virus de la rubéola en el primer trimestre de embarazo supone un riesgo muy alto de SRC [2-5].

No puede excluirse la reinfección, pero se desconoce su frecuencia durante el embarazo. La mayoría son inaparentes y sin riesgo para el embrión [1, 4, 7].

El virus de la rubéola es endémico en todo el mundo. En poblaciones no vacunadas, entre el 80% y el 90% de los niños se infectan. En 2018, se comunicaron 15 000 casos de SCR a la OMS, frente a los aprox. 670 000 en 2000, la mayoría de los cuales se produjeron en países de la OMS del sudeste asiático y africanos con tasas bajas de vacunación [2, 4].

Desde la aparición del sarpullido, se producen IgM específicos contra el virus de la rubéola y permanecen detectables durante al menos de 6 a 8 semanas [2-4, 8]. Especialmente tras la vacunación, los IgM pueden persistir durante más de 6 meses y también aparecen en el curso de las reinfecciones [7, 8]. Los IgG específicos aparecen al cabo de unas semanas del inicio de la infección y normalmente persisten de por vida. La mayoría de los anticuerpos neutralizantes se dirigen a E1 [4-6].

El diagnóstico clínico de la rubéola es muy poco fiable y deben realizarse ensayos de laboratorio en los casos sospechosos de infección por rubéola [2-4, 7, 8]. La detección de patógenos y la serología están disponibles. Una infección aguda se confirma mediante un resultado de IgM positivo o un aumento de cuatro veces del título de IgG entre dos muestras de suero tomadas con una separación de 2 a 4 semanas y determinados en el mismo análisis [1-4, 8].

Un resultado de IgM positivo durante el embarazo debe verificarse mediante otro método de ensayo en combinación con un ensayo RCP con un material de muestra faríngea, de orina o sangre, o mediante un Immunoblot para determinar la avidez de IgG específicos de anticuerpos contra la proteína estructural del virus de la rubéola E2. Estos anticuerpos aparecen de 3 a 5 meses tras la infección [1, 2, 4, 8]. Los IgG contra el virus de la rubéola de baja avidez normalmente persisten durante 2 a 3 meses e indican una infección primaria reciente [3, 4, 8]. Los anticuerpos de alta avidez indican una vacunación previa, una infección que se produjo al menos hace 3 meses o una reinfección [1, 3, 7].

Un resultado de IgG positivo se considera suficiente prueba de una protección inmunológica [2].

Pueden aparecer exantemas similares al sarpullido de la rubéola en caso de sarampión, escarlatina, eritema infeccioso (quinta enfermedad, parvovirus B19), *exanthema subitum* o roséola (virus del herpes humano 6) o por causa de la medicación [2-4, 8].

Referencias bibliográficas

1. Wellinghausen N, Abele-Horn M, Donoso Mantke O, Enders M, Fingerle V, Gärtner B et al. **MiQ Immunological Methods for the Detection of Infectious Diseases**. INSTAND e. V. Schriftenreihe. 2018. ISBN 978-3-87185-518-4
2. RKI-Ratgeber. **Röteln**. www.rki.de, Stand 5. 8. 2021
3. Leung AKC, Hon KL, Leong KF. **Rubella (German measles) revisited**. Hong Kong Med J. 2019; 25(2): 134-41



4. Darai G, Handermann M, Sonntag H-G, Zöller L (Hrsg.) **Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen**. 4. Auflage, 2012, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 978-3-642-17157-4
5. Petrova EK, Dmitrieva AA, Trifonova EA, Nikitin NA, Karpova OV. **The key role of rubella virus glycoproteins in the formation of immune response, and perspectives on their use in the development of new recombinant vaccines**. Vaccine. 2016; 34(8): 1006-11
6. Vauloup-Fellous C. **Standardization of rubella immunoassays**. J Clin Virol. 2018; 102: 34-8
7. Grangeot-Keros L, Bouthry E, Vauloup-Fellous C. **La rubéole : une question d'actualité ?** Presse Med. 2014; 43(6 Pt 1): 698-705
8. Hübschen JM, Bork SM, Brown KE, Mankertz A, Santibanez S, Ben Mamou M, et al. **Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination**. Clin Microbiol Infect. 2017; 23(8): 511-5

Responsabilidad

El equipo de ensayo, incluidos los accesorios originales, únicamente debe ser utilizado de acuerdo con su uso previsto. EUROIMMUN no asume ninguna responsabilidad por ningún otro uso (p. ej., falta de cumplimiento de las instrucciones de uso o uso inadecuado) ni por los daños que resulten de ello.

Soporte técnico

En caso de problemas técnicos, puede obtener asistencia a través del sitio web de EUROIMMUN (<https://www.euroimmun.de/en/contact/>).

Información adicional

Información reglamentaria para compradores dentro de la Unión Europea: Tenga en cuenta la obligación de informar sobre cualquier incidente grave que se produzca en relación con este sistema de ensayo a las autoridades competentes y a EUROIMMUN.

