

INSTRUCCIONES DE USO

Juego EIA de anticuerpos IgM frente a *Rickettsia* del grupo de fiebre tifoidea

Núm. de referencia: RTM-96K
Cantidad: 96 pruebas
(12 x 8 pocillos)
Almacenamiento: 2-8 °C

Inmunoensayo enzimático indirecto para la detección de anticuerpos clase IgM frente a *Rickettsia* (grupo de fiebre tifoidea) en plasma o suero humanos

Sólo para uso diagnóstico in vitro



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, California 92831 EE. UU.
Tel.: +1-714-525-7660
Correo electrónico: info@fullerlabs.com
www.fullerlabs.com



MediMark Europe Sarl
11, rue Émile Zola – BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 – Francia

USO PREVISTO

El juego EIA de anticuerpos IgM frente a *Rickettsia* del grupo de fiebre tifoidea está diseñado para la detección de anticuerpos clase IgM humanos frente a *Rickettsia* del grupo de fiebre tifoidea, para utilizarse como auxiliar en el diagnóstico de la infección por dicho patógeno en el ser humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La especie *Rickettsia* del grupo de fiebre tifoidea es de distribución mundial. La infección induce una respuesta de anticuerpos específicos que puede detectarse y emplearse como medio indirecto de identificación de una persona infectada.

Los micropocillos de la prueba EIA de este juego emplean un antígeno proteico (rOmp) específico de grupo y extraído de *Rickettsia typhi*, miembro del grupo de fiebre tifoidea. Entre otras especies que tienen esta reactividad cruzada serológica figuran *Rickettsia prowazekii*. Los sueros de paciente se diluyen en un diluyente de muestra y se incuban en los micropocillos recubiertos para permitir la unión del anticuerpo sérico con los antígenos de fase sólida. Seguidamente se lavan los micropocillos para eliminar las proteínas séricas que no han reaccionado y se agrega un anticuerpo anti-IgM humana marcado con enzima (conjugado enzimático), para marcar el anticuerpo unido. Después de un periodo de incubación, se vuelven a lavar los micropocillos para eliminar el conjugado enzimático que no se haya unido. A continuación se agrega un sustrato enzimático (sustrato TMB) para cuantificar la porción de peroxidasa unida del conjugado. La intensidad del color azul formado es proporcional a la concentración de anticuerpo sérico reactivo. Esta reacción cronometrada es detenida con una solución de parada que transforma el color de las reacciones de azul a amarillo y estabiliza la intensidad del color final. Se determina la intensidad del color (absorbancia) a una longitud de onda de 450 nm mediante un lector de microplacas o espectrofotómetro.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

MW | Ag **Módulo EIA de 96 micropocillos**
12 tiras de 8 micropocillos c/u recubiertos con rOmpB extraído de *Rickettsia typhi* y envasadas con desecante, listas para usar.

SAMP DIL **Diluyente de Muestra 50 ml x 2**
Tampón PBS con albúmina de suero bovino y Tween 20.

IgM | DIL **IgM Diluyente de Suero, 10 ml**
PBS con anticuerpos de cabra anti-IgG humana (específicos para Fc[γ]).

CONJ | HRP **Conjugado Enzimático, 12 ml**
Conjugado de anticuerpos de cabra anti-IgM humana marcados con peroxidasa (específicos para cadena gamma), purificado por afinidad; listo para usar. **Protéjalo de la luz.**

CONT + **Control Positivo, 120 µl**
Vial de tapa azul con suero humano (**diluido 1:10**) reactivo con *Rickettsia* del grupo de fiebre tifoidea.

CAL **Calibrador de Valor Límite, 200 µl**
Vial de tapa verde con suero humano (**diluido 1:10**) ambiguamente reactivo con *Rickettsia* del grupo de fiebre tifoidea.

CONT -**Control Negativo, 120 µl**

Vial de tapa roja con suero humano (**diluido 1:10**) no reactivo con *Rickettsia* del grupo de fiebre tifoidea.

SUBS TMB**Sustrato TMB, 12 ml**

Solución con H₂O₂ y tetrametilbencidina (TMB), envasada en un frasco ámbar. Lista para usar. Protéjala de la luz.

SOLN STOP**Solución de Parada, 12 ml**

Ácido sulfúrico diluido, listo para usar. Evite el contacto con la piel.

BUF WASH PBS**PBS, 1 litro**

Añada el paquete suministrado a 1 l de agua purificada para producir tampón PBS de pH 7,2. Mezcle muy bien. **Tampón de Lavado: "Preparación de muestras y reactivos"**

BUF WASH TWEEN**Tween 20, 2 ml**

Solución con 25 % de Tween 20 y 75 % de PBS. **Tampón de Lavado: "Preparación de muestras y reactivos"**

Advertencias

1. Los sueros de control han sido analizados mediante métodos aprobados por la FDA para determinar la ausencia de agentes infecciosos. Sin embargo, dado que ningún ensayo puede garantizar dicha ausencia, estos reactivos, como también los sueros y equipos que estén en contacto con estas muestras, deben ser manipulados siguiendo buenas prácticas de laboratorio a fin de evitar su ingestión o contacto con la piel.
2. Si bien los micropocillos de ensayo han sido preparados con antígenos inactivados, deben considerarse como materiales capaces de transmitir agentes infecciosos y manejarse como tal.

Almacenamiento y manejo

Los componentes del juego deben almacenarse a temperaturas de 2-8 °C. Permita que lleguen a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de abrir los frascos y bolsas de placas.

Vuelva a guardar las tiras de antígeno no utilizadas en el envase con desecante y selle muy bien el envase.

TOMA DE MUESTRAS

Permita que las muestras sanguíneas se coagulen y separe los sueros por centrifugación. Mediante una técnica aséptica, transfiera los sueros a recipientes estériles con cierre hermético. Almacénelos a 2-8 °C. Si se va a posponer el ensayo por más de 5 días, almacene las muestras a temperaturas no mayores de -20 °C. Las muestras de fase aguda deben tomarse al comienzo de la enfermedad, mientras que las de fase convaleciente deben tomarse a intervalos de dos y cuatro semanas para determinar si hay cambios en los títulos.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y REACTIVOS

1. **Prepare un Tampón de Lavado** añadiendo el contenido del frasco Tween 20 (2 ml) a 1 l de tampón PBS. Mezcle muy bien el contenido.
2. **Prepare diluciones 1:10** de los tres (3) sueros del calibrador/control mediante el diluyente de muestra. No diluya más lejos

3. **Mediante el IgM Diluyente de Suero, prepare diluciones 1:10** de todas las muestras séricas de pacientes suministrados. Mezcle bien y espere un mínimo de 5 minutos para el desarrollo de agregados de precipitación.
4. **Mediante el Diluyente de Muestra, prepare diluciones 1:10 de las mezclas preparadas en el paso 3. El suero final tiene ahora una dilución 1:100.**

PROCEDIMIENTO

Este juego contiene reactivos y materiales suficientes como para efectuar 96 determinaciones.

Materiales requeridos pero no suministrados

1. Agua purificada (destilada o desionizada)
2. Frascos de lavado o máquina de lavado automático de EIA
3. Tubos de ensayo para diluciones manuales del suero o diluidor automático para diluciones 1:100
4. Pipetas de precisión para volúmenes de microlitros
5. Tapa adhesiva o plástica para las incubaciones de los micropocillos
6. Lector de EIA equipado con un filtro de 450 nm

Precauciones

1. No use los componentes después de su fecha de caducidad.
2. El Sustrato TMB y el Conjugado Enzimático son sustancias fotosensibles y se envasan en frascos de color ámbar para su protección. Almacénelos en la oscuridad y vuelva a almacenarlos después de usarlos.
3. Los reactivos líquidos contienen timerosal al 0,01 %, que puede ser tóxico en caso de ingerirse.
4. La Solución de Parada contiene ácido sulfúrico 0,2 N. Si este ácido cae en la piel, lave muy bien el área afectada con agua y busque atención médica.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de comenzar el procedimiento de ensayo cronometrado, lleve todos los reactivos y sueros a temperatura ambiente.

1. **Pipetee 100 µl de cada suero y control diluidos en los micropocillos** correspondientes. Se recomienda analizar el calibrador de valor límite diluido en pocillos duplicados.
2. Cubra los micropocillos para reducir la evaporación a un mínimo; seguidamente **incúbelos por 60 minutos a temperatura ambiente** (20-25 °C).
3. **Lave las placas cuatro (4) veces** con un chorro suave de tampón de lavado (con una pisetita) o con un lavador de placas EIA de múltiples pocillos. Elimine de los pocillos los restos de tampón de lavado.
4. Añada a cada micropocillo **100 µl de Conjugado Enzimático**. Cúbrelas e incúbelos por **30 minutos a temperatura ambiente** en un lugar oscuro.
5. **Lave los micropocillos** tal como se describe en el paso 3 anterior.
6. En secuencia cronometrada, **añada a cada micropocillo 100 µl de Sustrato TMB** y deje que la reacción prosiga durante un **tiempo exacto de 10 minutos** en la oscuridad.

7. Con la misma secuencia cronometrada anterior, detenga la reacción añadiendo **100 µl de Solución de Parada**.
8. Lea la absorbancia mediante un lector de microplacas equipado con un **filtro de 450 nm**.

CONTROL DE CALIDAD

Se suministra un Calibrador de Valor Límite para diferenciar los sueros reactivos de los no reactivos. Dicho Calibrador se fija en un índice de 1,0. Al dividir las absorbancias de los sueros de prueba por las absorbancias medias del Calibrador de Valor Límite, se obtiene un índice por cada suero. Los índices entre 0,9 y 1,1 pueden considerarse como ambiguos; los mayores de 1,1 son considerados positivos, y los menores de 0,9, negativos.

LIMITACIONES

Este procedimiento detecta anticuerpos específicos de grupo y por consiguiente no tiene capacidad para diferenciar entre miembros del grupo de fiebre tifoidea. En general, no se detecta la reactividad al grupo de fiebre maculosa o al tífus de los matorrales (enfermedad de Tsutsugamushi).

VALORES ESPERADOS

La prevalencia de anticuerpos específicos varía según las condiciones geográficas y demográficas del ensayo. Se han observado áreas endémicas con tasas de seropositividad entre 7 y 26 %, algunas de las cuales fueron, sin duda, casos leves o subclínicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. La Scola, Bernard y Didier Raoult. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 2715 – 2727
2. Raoult, Didier y Gregory A. Dasch. J. Clin. Microbiol. 1989; 27: 2073 – 2079.

Versión B (3-2005)