

1	Propósito
2	Introducción
3	Principio del método
4	Precauciones
5	Obtención y conservación de las muestras
6	Materiales
7	Procedimiento
8	Resultados y control de calidad
9	Nivel de protección
10	Valores típicos
11	Características del ensayo
12	Referencias

VaccZyme™ kit EIA para la determinación de anticuerpos IgG anti-tétanos toxoide

Para uso diagnóstico *in-vitro*

Código producto : MK010

Fabricado por:
The Binding Site Group Ltd, PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, U.K.
www.bindingsite.co.uk

The Binding Site Spain S.L.U.,
C/ Balmes 243 4º 3ª, 08006 Barcelona
Teléfono 902027750
Fax: 902027752
e-mail: info@bindingsite.es
web: www.bindingsite.es

VaccZyme™ es una marca de The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK



1 UTILIZACIÓN

Este kit está preparado para la medición *in vitro* de anticuerpos anti-tétanos toxoide (TTox) IgG específicos presentes en el suero, con el fin de determinar el estado de protección del individuo.

El kit contiene suficiente material para realizar máximo 39 tests en duplicado u 87 en tests simples junto con una curva de calibración de 7 puntos y 2 controles.

En caso de no requerir una sensibilidad inferior a 0,09 IU/mL puede reducirse los puntos de calibración de la curva de calibración de 7 a 5.

2 INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos anti-tétanos-toxoide se forman como reacción a la vacuna con la proteína del tétanos toxoide. La respuesta a la vacunación puede entonces cuantificarse por la determinación en suero de anticuerpos anti-tétanos toxoide por medio de este kit. Pacientes con infecciones recurrentes deberán ser investigados a un posible defecto inmunológico debido a anomalías del timo y consecuentemente la incapacidad de responder a los antígenos bacterianos específicos¹.

3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los micropocillos están impregnados con antígeno tétanos toxoide. Los calibradores, controles y muestras de paciente diluidas son aplicados a los pocillos y los anticuerpos reconociendo el antígeno de tétanos toxoide se fijan en la primera incubación. Tras el lavado de los pocillos para eliminar todas las proteínas no fijadas, se añade IgG purificada de conejo anti-humano marcada con peroxidasa. El conjugado se fija al anticuerpo humano capturado y el exceso de conjugado no fijado se elimina mediante un segundo lavado. El conjugado fijado se visualiza con tetrametilbenzidina 3,3',5,5' (TMB) dando un color azul. La intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpos en la muestra. Para parar la reacción se añade a cada pocillo ácido fosfórico. Esto produce un color amarillo a punto final, legible a 450nm.

4 PRECAUCIONES

4.1 ADVERTENCIA

Los sueros humanos suministrados en el kit han sido sometidos a screening para donantes, resultando negativos a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B y a la presencia de los anticuerpos de la ante los virus HIV1, HIV2 y HCV. Las técnicas usadas están aprobadas por la FDA (USA) o para el diagnóstico *in vitro* por la UE (Directiva 98/79/EC, Anexo II). Sin embargo los sobredichos ensayos no garantizan la ausencia de agentes infecciosos. Por lo tanto, deben tratarse los reactivos como potencialmente infecciosos. Tanto la manipulación como los métodos de eliminación de desechos deberán realizarse conforme a la normativa de materiales infecciosos y solo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

Los componentes del kit contienen azida sódica y ProClin 300 y debe ser manipulados con precaución; use guantes y vestuario protector adecuado en todo momento al manipular este producto. No trague ni permita el contacto con la piel o las mucosas (especialmente si hay heridas). En caso de contacto, lave con abundante agua y consulte a un médico. Con el plomo y el cobre pueden formarse azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo, lave con mucha agua los recipientes para evitar la acumulación de azida.

Los tampones y sueros suministrados con este kit contienen diferentes inhibidores enzimáticos según sigue. Son productos peligrosos y se deben manipular con precaución.

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN
Kathon	0,02%
Azida sódica	0,099%
ProClin™ 300	0,045%
Bromodinitrodioxano	0,002%
Metilisotiazona	0,002%

ProClin™ es una marca de Rohm and Haas Corp. Philadelphia, PA

Kathon es un producto irritante y puede producir sensibilización en contacto con la piel. La solución de parada contiene ácido fosfórico 3M. Es irritante y debe evitarse el contacto con la piel y ojos. Los métodos de eliminación de desechos deberán realizarse conforme a la normativa local de materiales infecciosos.

4.2 MEDIDAS DE SEGURIDAD

La manipulación de este producto deberá realizarse solo por personal adecuadamente instruido.

Se recomienda seguir estrictamente el procedimiento descrito en estas instrucciones de empleo. De no seguir estas instrucciones, no se pueden garantizar los resultados. Tener especial atención a las "Notas" y advertencias descritas en estas instrucciones.

NO SE PUEDEN mezclar reactivos con diferentes números de lote ni utilizar conjuntamente. En caso de realizar gran cantidad de pruebas, deberá tenerse en cuenta que todos los reactivos sean del **MISMO LOTE**. Todas las tiras deben proceder del mismo paquete. La sustitución de alguno de los componentes puede conllevar a unos resultados erróneos.

Para evitar contaminación utilizar solo fungibles o vidrio nuevos o esterilizados. **Nunca** volver a echar los reactivos no utilizados a las botellas.

No dejar las botellas de reactivos destapadas. La posible evaporación o contaminación puede conllevar a resultados erróneos.

El substrato TMB no se debe exponer a luz o agua.

No deben emplearse suero contaminado microbiológicamente, hemolizado o muy lipémico así como aquellas muestras que contengan partículas en suspensión.

La dilución incorrecta no se puede comprobar ya que los controles del kit están listos para usar. Se recomienda utilizar pipetas calibradas y muestras internas con Control de Calidad.

Al usar sistemas de ensayo automatizados, diluyentes de muestra y otros equipos automáticos, siga con atención las instrucciones del fabricante. Se debe tener especial cuidado con la configuración e instalación del equipo y la conexión a servicios externos. Se deben seguir con atención todos los parámetros de los lectores y de los aclaradores automáticos y seguir las instrucciones del fabricante para el mantenimiento del equipo.

4.3 Almacenamiento y estabilidad

El kit debe almacenarse entre 2 y 8°C y **no** debe congelarse. Un almacenamiento inadecuado afectará a los resultados. El tampón de lavado diluido puede almacenarse en un recipiente limpio a temperatura ambiente por un tiempo máximo de 4 semanas. La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta exterior.

5 OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre deben provenir de extracciones venosas, se dejan coagular naturalmente, separando después el suero. El suero debe almacenarse entre 2-8°C hasta 48 horas antes del análisis. Para una conservación más prolongada se recomienda congelar las muestras sin diluir a -20°C o menos. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones. Las muestras de suero **no** deben inactivarse por calor, ya que esto daría resultados falsos positivos.

6 MATERIALES

6.1 MATERIALES SUMINISTRADOS

- 6.1.1 Hoja de instrucciones: Detallada.
- 6.1.2 Certificado QC: Indicando los resultados esperados del lote.
- 6.1.3 *T.Tox Coated Wells* (Pocillos tapizados con T.Tox): 12 tiras de 8 pocillos cada una separables impregnados con tétanos toxide derivado de *Clostridium tetani*. Cada placa está envasada en una bolsa reutilizable conteniendo 1 desecante.
- 6.1.4 *Sample Diluent* (Diluyente muestra): 2 botellas (amarillas) con 50mL cada una de tampón para diluir las muestras. Listo para usar.
- 6.1.5 *Wash Buffer* (Tampón de lavado): 1 botella con 50mL de tampón con una concentración 20 veces para el lavado de los pocillos.
- 6.1.6 *T.Tox IgG Calibrators* (Calibrador(es) IgG T. Tox): 7 botellas con 1,2mL cada una de suero humano diluido con las siguientes concentraciones de anticuerpo anti-tétanos toxoide: 7; 2,33; 0,78; 0,26; 0,09; 0,03; 0,01 IU/mL. Listo para usar.
- 6.1.7 *T.Tox IgG High Control* (Control alto IgG T.Tox): 1 botella conteniendo 1,2mL de suero humano diluido. El valor esperado se indica en el certificado QC. Listo para usar.
- 6.1.8 *T.Tox IgG Low Control* (Control bajo IgG T.Tox): 1 botella conteniendo 1,2mL de suero humano diluido. El valor esperado se indica en el certificado QC. Listo para usar.
- 6.1.9 *T.Tox IgG Conjugate* (Conjugado IgG T.Tox): 1 botella (roja) conteniendo 12mL de anticuerpo purificado marcado con peroxidasa anti IgG humana. Listo para usar.
- 6.1.10 *TMB Substrate* (Substrato TMB): 1 botella conteniendo 14mL de substrato TMB. Listo para usar.
- 6.1.11 *Stop Solution* (Solución de parada): 1 botella conteniendo 14mL de ácido fosfórico 3M. Listo para usar.

6.2 MATERIAL ADICIONALMENTE NECESARIO, pero no suministrado

- 6.2.1 Lavador automático de microplacas: Es sólo una recomendación, ya que puede realizarse manualmente.
- 6.2.2 Lector de placas: Capaz de medir densidades ópticas a 450nm calibrado al aire.
- 6.2.3 Agua destilada o desionizada: esta debe ser de la máxima calidad posible.
- 6.2.4 Micropipetas calibradas: Para dispensar 1000, 100 & 10µL.
- 6.2.5 Pipeta multicanal: Recomendada para dispensar volúmenes de 100µL.
- 6.2.6 Tubos de vidrio/plástico: Para dilución de las muestras.

7 PROCEDIMIENTO

7.1 PASOS PREVIOS

1. Atemperar a temperatura ambiente

El kit está diseñado para trabajar a temperatura ambiente (20-24°C).

Sacar el kit de su embalaje y dejar a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos. Los pocillos **no** deben sacarse de su embalaje antes de alcanzar la temperatura ambiente.

Nota: Este kit puede mantenerse a temperatura ambiente hasta 1 semana.

2. Componentes del kit

Mezclar con cuidado cada componente del kit antes de usar.

3. Dilución tampón de lavado

Añadir 50mL del tampón de lavado concentrado a 950mL de agua destilada (dilución 1 en 20) en un contenedor limpio y mezclar. Se pueden diluir volúmenes más pequeños según sea adecuado.

Nota: El tampón de lavado diluido debe conservarse a temperatura ambiente durante un máximo de 4 semanas; diluya, por lo tanto, solamente la cantidad necesaria.

4. Dilución de muestra

Diluir 10µL de cada muestra con 1000µL de diluyente (1:100) y mezclar bien. Se pueden diluir volúmenes más pequeños según sea adecuado.

Nota: Las muestras diluidas **tienen** que emplearse dentro de 8 horas.

5. Manipulación de las tiras y el marco

Colocar el número necesario de pocillos en el contenedor de tiras. Desde la posición del pocillo A1 rellenar las columnas de izquierda a derecha. Mientras se manipula la placa, apretar los cantos largos del marco para evitar que los pocillos se salgan.

Nota: Devolver inmediatamente a la bolsa los pocillos no utilizados con los desecantes y cerrar fuertemente con el fin de minimizar la exposición a la humedad. Tener cuidado de no punzar o rasgar la bolsa.

ADVERTENCIA: La exposición de los pocillos a la humedad o contaminación por polvo u otras partículas conlleva a una degradación del antígeno llegando a obtener resultados imprecisos y potencialmente falsos.

7.2 PROCEDIMIENTO

Mantener la misma secuencia de dispensación durante todo el test.

1. Adición de la muestra

Aplicar 100µL de cada de calibrador, control y muestra diluida (1:100) a los pocillos correspondientes.

Nota: Las muestras deben aplicarse lo más rápido posible para minimizar la deriva del análisis, y poner en marcha el cronómetro después de la adición de la última muestra.

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

2. Lavado

El proceso de lavado es crítico y requiere una atención especial. Una placa lavada impropia conlleva a obtener unos resultados inexactos con escasa precisión y elevados valores de fondo.

Tras la incubación sacar la placa y lavar los pocillos 3 veces con 250-350µL de tampón de lavado por cada pocillo. Lavar la placa con un lavador de placas automático o manualmente según las siguientes indicaciones. Si se realiza el lavado automático, invertir la placa al final del lavado y sacudir los pocillos sobre papel absorbente.

Las placas pueden lavarse manualmente según sigue:

- a. Verter el contenido de placa al fregadero.
- b. Sacudir los pocillos sobre papel absorbente hasta que se sequen.
- c. Echar en cada pocillo 250-350µL de tampón de lavado utilizando una pipeta multicanal.
- d. Con cuidado agitar la placa sobre una superficie plana.
- e. Repetir a-d dos veces.
- f. Repetir a y b.

3. Adición del conjugado

Pipetear 100µL de conjugado a cada pocillo, secar la parte superior del pocillo con un pañuelo de papel para eliminar salpicaduras.

Nota: Para evitar contaminación, nunca devolver el exceso de conjugado a la botella.

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Lavado

Repetir punto 2.

5. Adición del substrato (TMB)

Pipetear 100µL de substrato TMB en cada pocillo, secar la parte de arriba de los pocillos con un pañuelo de papel para eliminar salpicaduras.

Nota: Para evitar contaminación, nunca devolver el exceso de TMB a la botella.

Incubar 30 minutos a oscuras y a temperatura ambiente.

6. Parada

Pipetear 100µL de la solución de parada en cada pocillo. Esto dará un cambio de color de azul al amarillo.

7. Medición de la densidad óptica

Leer la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 450nm en un lector de microplacas en los siguientes 30 minutos a la reacción.

8 RESULTADOS Y CONTROL DE CALIDAD

1. Control de calidad

Para que el test sea válido este debe cumplir con los siguientes criterios:

- Cada serie debe incluir los controles positivo y negativo.
- Los valores obtenidos deben estar dentro los rangos especificados en el Certificado QC.
- La forma de la curva debe ser similar a la curva de calibración indicada en el Certificado QC.

Si no se cumplen los criterios anteriormente citados, el test no es válido y se debe repetir.

2. Cálculo de la medias de las densidades ópticas (Solo para ensayos que se lleven a cabo en duplicado)

Calcular la media de la DO para cada calibrador, control y muestra. El porcentaje del coeficiente de variación (% CV) para cada DO en duplicado debe ser inferior de 15%.

3. Trazado de la curva de calibración

La curva de calibración puede trazarse automática o manualmente según sigue trazando la concentración de anticuerpo anti-tétanos toxoide IgG sobre la escala logarítmica contra la DO de la escala lineal para cada calibrador:

- Automáticamente – usar un software validado apropiado y la curva será la más idónea a los datos que correspondan.
- Manualmente – utilizando papel logarítmico dibujar una línea suave a través de los puntos (no una línea recta o punto a punto).

4. Tratamiento de puntos anómalos

En caso de que alguno de los puntos esté fuera de la línea, este se puede eliminar. Si la ausencia de este punto significa que la forma de la curva no es similar a la curva de calibración de la muestra o si más de un punto aparece anómalo, el test debe repetirse.

5. Cálculo de los valores de control

Leer el nivel de auto anticuerpo anti-tétanos toxoide IgG de la curva de calibración. Los valores deben estar dentro de los rangos indicados en el Certificado QC.

6. Cálculo de los niveles de autoanticuerpos en muestras diluidas

Leer el nivel de auto anticuerpo anti-tétanos toxoide IgG de las muestras diluidas directamente de la curva de calibración.

Nota: Los valores del calibrador han sido ajustados con un factor 100 considerando una dilución de muestra del 1:100, por lo tanto no se requiere una posterior conversión.

7. Calibración del test

El test se ha calibrado contra un calibrador de referencia NIBSC 79/589 suministrada de Nacional Institute for Biological Standards and Control (NIBSC: nibsc.ac.uk).

8. Limitaciones

Muestras de pacientes con vacunación previa o posterior deberán ser testadas simultáneamente. El kit es para el apoyo en el diagnóstico. Un resultado positivo sugiere determinada enfermedad que debe confirmarse con otros análisis serológicos y clínicos. Los resultados obtenidos con este test no es una prueba confirmatoria de falta de protección / protección de tétanos o la presencia o ausencia de inmunodeficiencia.

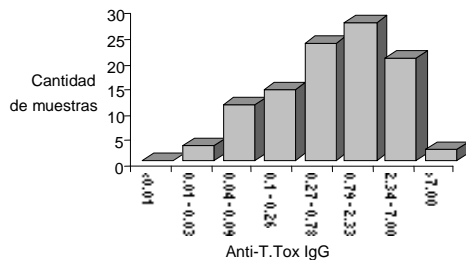
9 NIVEL DE PROTECCIÓN

En una población normal, la literatura indica un nivel de anticuerpos de protección de entre 0,01 y 0,15 IU/mL^{2,3,4}. El estudio más grande realizado en EE.UU.², incluyó un colectivo de 10618 individuos con una edad de a partir de 6 años. En su totalidad, el 69,7% tenían una concentración de anticuerpos de >0,15 IU/mL. En el tramo de edad de 6 a 11 años el 87,7% mostraban anticuerpos y los mayores de 70 años solo el 27,8% tenían anticuerpos. Los resultados de otros dos estudios^{3,4} dieron una protección con una concentración de anticuerpos de 0,01 IU/mL.

Dado a las grandes diferencias citadas, recomendamos que cada laboratorio establezca su propio rango normal de protección.

10 VALORES TÍPICOS

La concentración de anticuerpos anti-tétanos toxoide IgG se determinó en sueros de 100 donantes de sangre normales (con desconocimiento si existía vacunación o estado inmunológico). Los resultados se han resumido en el gráfico siguiente. Estos valores son a título orientativo y no deberán emplearse para determinar el rango normal.



Se determinó un rango normal empleando el kit tétanos toxoide (MK010) de The Binding Site. Ver referencia 5.

11 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

11.1 PRECISIÓN

La intra- e inter-precisión se midieron utilizando tres muestras dentro del rango de la curva de calibración. La concentración media y el % C.V. para cada muestra se indica seguidamente:

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO		
Muestra n = 16	Concentración media IU/mL	% CV
Muestra 1	4,05	2,31
Muestra 2	1,21	2,65
Muestra 3	0,51	5,06

PRECISIÓN INTER-ENSAYO		
Muestra n = 18	Concentración media IU/mL	% CV
Muestra 1	3,77	8,81
Muestra 2	0,98	7,99
Muestra 3	0,47	5,63

11.2 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica se determinó de la concentración media +2 SD de 16 determinaciones de diluyente de muestra. Esto equivale a 0,0093 IU/mL.

11.3 RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del test es de 0,01 – 7 IU/mL.

11.4 SUBSTANCIAS INTERFERENTES

Se han añadido una serie de sustancias interferentes en algunas sueros para probar los posibles efectos interferentes. El método utilizado para verificar estas sustancias se basó en el kit Interference Check A plus™ - Kokusai Shiyaku, Japón.

Sustancia	Concentración
Bilirrubina F (libre)	183mg/mL
Bilirrubina C (conjugado)	190mg/mL
Hemoglobina hemolizada	4900mg/mL
Quilo	19300 unidades
Factor reumatoide	500 IU/mL

No se observaron interferencias con bilirrubina F o C, hemoglobina hemolizada, lípidos o factores reumatoides.

12 REFERENCIAS

1. Berger M. Immunoglobulin G subclass determination in diagnosis and management of antibody deficiency syndromes. *The Journal of Paediatrics*, 1987; **2**:325-328.
2. Gergen P. J *et al.* A population-based serologic survey of immunity to tetanus in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 1995; **332**:761-766.
3. Bjorkholm B. *et al.* Immune status and booster effects of low doses of tetanus toxoid in Swedish medical personnel. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1994; **26**: 471-475.
4. Ramsay M. E. B *et al.* Persistence of antibody after accelerated immunisation with diphtheria / tetanus / pertussis vaccine. *British Medical Journal*, 1991; **302**: 1489-1491.
5. Schauer U. *et al.* Levels of antibody specific to Tétanos toxoid, *Haemophilus influenzae* type b, and Pneumococcal Capsular Polysaccharide in healthy children and adults. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Mar 2003: 202-207.