

# VaccZyme™ Anti-PCP IgG Kit EIA

Spanish

## Para uso diagnóstico *in-vitro*

### Código producto : MK012

Fabricado por:

The Binding Site Group Ltd., PO Box 11712, Birmingham B14 4ZB, UK.  
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 PROPÓSITO

El propósito de este test *in-vitro* es para la determinación de anticuerpos IgG específicos a Polisacárido Capsular Pneumococico (PCP).

El kit contiene suficiente material para realizar máximo 41 tests en duplicado u 89 en tests simples junto con una curva de calibración y 2 controles.

#### 2 INTRODUCCIÓN

El kit está diseñado para medir la respuesta de anticuerpos a las vacunas pneumococicas incorporando 23 polisacáridos aislados de *Streptococcus Pneumoniae*. Estos polisacáridos representan aproximadamente el 80% de los serotipos virulentos más comunes. La inmunización con la vacuna 23-valente se recomienda a:

- pacientes mayores, con el fin de reducir el índice de mortandad por neumonías.
- niños, mayores de 2 años y que posean un riesgo de muerte por enfermarse de una infección pneumococica<sup>2</sup>.

La respuesta inmunológica del 30% de los sujetos vacunados con *S. pneumoniae* se atribuye a los anticuerpos C-polisacárido (CPS) y no a los IgG PCP específicos. Estos anticuerpos CPS confieren una protección limitada contra una infección pneumococica; por tanto se incorpora la absorción CPS en este test.<sup>3</sup>

La respuesta inmunológica de un paciente puede medirse por la determinación serológica de su concentración de anticuerpos IgG anti-PCP antes y después de una vacuna por medio de un test EIA cuantitativo. Los pacientes con infecciones bacterianas repetitivas se deberán examinar si tienen inmunodeficiencia y por consiguiente a la inhabilidad de su respuesta a antígenos polisacáridos específicos (review<sup>4,5</sup>).

#### 3 PRINCIPIO DEL TEST

Los micropocillos están pre-impregnados con antígeno PCP (1-5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F – nomenclatura danesa). Los calibradores y los controles están preadsorvidos contra polisacárido capsular y las muestras están diluidas en un diluyente que contiene CPS. Los calibradores, controles y muestras de paciente diluidas son aplicados a los pocillos y los autoanticuerpos reconociendo el antígeno de PCP 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 (específico de cadena  $\gamma$ ). 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 autoanticuerpos 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 ADVERTENCIAS Y MEDIDAS DE SEGURIDAD

##### 4.1 ADVERTENCIA

El material de partida para la elaboración de los calibradores y controles proviene de sangre humana. Cada una de las muestras han sido examinadas y libres de anticuerpos del virus del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (HIV 1 & 2), Hepatitis C así como antígenos superficiales de Hepatitis B (HBsAG). No obstante, hasta la fecha no existen métodos seguros para la exclusión de estos agentes infecciosos ni de otros. 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 sólo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

La azida sódica puede formar ácidos metálicos explosivos en contacto prolongado con tubos de plomo o cobre. Tras la eliminación aclarar con gran cantidad de agua con el fin de evitar depósitos de azida.

Los tampones y sueros suministrados con este kit contienen diferentes inhibidores enzimáticos según sigue. Estos deben manipularse con cuidado.

INHIBIDOR	CONCENTRACION
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 inapropiado 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 TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRA

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 CC: Indicando los resultados esperados del lote.

6.1.3 *PCP Coated Wells* (Pocillos impregnados con PCP): 12 tiras de 8 pocillos separables impregnados de antígeno PCP. Cada placa está envasada en una bolsa reutilizable conteniendo 2 desecante.

6.1.4 *PCP Sample Diluent* (Diluyente muestra PCP): 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 20 veces concentrado para el lavado de los pocillos.

6.1.6 *PCP IgG Calibrators* (Calibradores IgG PCP): 5 botellas con 1.2mL cada una de suero humano diluido con las siguientes concentraciones de anticuerpo IgG anti-PCP: 270, 90, 30, 10, 3,3mg/L. Listo para usar.

6.1.7 *PCP IgG High Control* (Control positivo IgG PCP): 1 botella conteniendo 1,2mL de suero humano diluido. El valor esperado se indica en el certificado QC. Listo para usar.

6.1.8 *PCP IgG Low Control* (Control negativo IgG PCP): 1 botella conteniendo 1,2mL de suero humano diluido. El valor esperado se indica en el certificado QC. Listo para usar.

6.1.9 *PCP IgG Conjugate* (Conjugado IgG PCP): 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.

##### 6.3 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 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:

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

Pipetear 100µL de sustrato 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 y los calibradores.
- Los valores obtenidos deben estar dentro los rangos especificados en el Certificado CC.
- La forma de la curva debe ser similar a la curva de calibración indicada en el Certificado CC.

**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

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-PCP 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-PCP IgG de la curva de calibración. Los valores deben estar dentro de los rangos indicados en el Certificado CC.

## 6. Cálculo de los niveles de autoanticuerpos en muestras diluidas

Leer el nivel de auto anticuerpo anti-PCP 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

Este kit se ha calibrado contra una preparación purificada por afinidad de un suero humano contra PCP.

## 8. Limitaciones

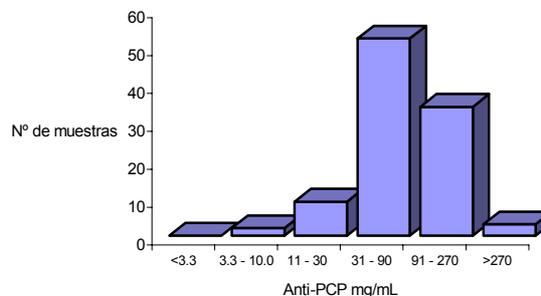
Muestras de pacientes con vacunación previa o posterior deberán ser testadas simultáneamente.

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 son una prueba confirmatoria de falta de protección / protección de infecciones pneumococicas o la presencia o ausencia de una inmunodeficiencia.

## 9 VALORES TÍPICOS

La concentración de anticuerpos IgG anti-PCP se determinó en sueros de 100 donantes de sangre normales (estado de vacunación e inmunidad desconocido). Los resultados se han resumido en el gráfico siguiente. Estos valores son a título orientativo y no deberán emplearse para determinar el rango normal.



Los niveles de anticuerpos pueden variar según el curso de la vacunación y del estado inmunitario, así como la pertenencia a un específico grupo de población<sup>5</sup>.

## 10 CARACTERÍSTICAS

### 10.1 PRECISIÓN

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

PRECISIÓN INTRA ENSAYO		
n = 16	Concentración mg/L	% CV
Muestra 1	10,9	5,0
Muestra 2	42,6	3,1
Muestra 3	172,9	5,9

PRECISIÓN INTER ENSAYO		
n = 3	Concentración mg/L	% CV
Muestra 1	10,0	7,8
Muestra 2	40,9	1,3
Muestra 3	141,2	3,3

### 10.2 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica se determinó de la concentración media + 2 SD de 20 determinaciones de diluyente de muestra. Esto equivale a 0,62mg/L

### 10.3 RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del test es de 3,3 – 270mg/L.

## 11 REFERENCIAS

- Robbins J B *et al.* Considerations for formulating the second generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *Journal of infectious diseases*, 1983; **148**: 1136-1159.
- Principles of internal medicine, ISBN 0-07-032371-2, volume 1:498-511.
- Musher D M *et al.* Pneumococcal polysaccharide vaccine in young adults and older bronchitics: Determination of IgG responses by ELISA and the effect of absorption of serum with non-type specific cell wall polysaccharide. *Journal of Infectious Diseases*, 1990; **161**: 728-735.
- Berger M. Immunoglobulin G subclass determination in diagnosis and management of antibody deficiency syndromes. *The Journal of Pediatrics*, 1987;**2**:325-328.
- Schauer U. *et al.* Levels of antibody specific to Tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* type b, and Pneumococcal Capsular Polysaccharide in healthy children and adults. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Mar 2003: 202-207.