

**VIROTECH Tetanus IgG ELISA
(Tetanus IgG ELISA)**

Referencia: EC124.00

Código de color: blanco/transparente

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Índice

1. Finalidad de la prueba	3
2. Principio de la prueba	3
3. Contenido (kit de ensayo IgG)	3
4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar	3
5. Medidas de precaución y advertencias	4
6. Material adicional necesario (no suministrado)	4
7. Realización de la prueba	4
7.1 Material de muestra	4
7.2 Preparación de los reactivos	4
7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH	5
7.4 Empleo de procesadores ELISA	5
8. Valoración del ensayo	5
8.1 Control del funcionamiento del ensayo:	5
8.2 Valoración	5
8.3 Interpretación	6
8.4 Limitaciones del ensayo	7
9. Evaluación del ensayo IgG mediante el método de 4 parámetros	7
9.1 Control del funcionamiento del ensayo	7
9.2 Conversión de los resultados cuantitativos en unidades internacionales por mililitro (UI/ml)	7
10. Literatura	8
11. Esquema de la realización de la prueba	9

1. Finalidad de la prueba

La prueba ELISA Tétano sirve para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG contra la toxoide tetánica, a fin de comprobar el éxito de la vacunación o determinar el estado de vacunación.

2. Principio de la prueba

El anticuerpo buscado en el suero humano forma un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son de nuevo eliminadas mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro.

3. Contenido (kit de ensayo IgG)

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 50 ml** pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Sueros patrón con anticuerpos IgG** para elaborar la curva patrón, 6 frascos de 2 ml cada uno, listos para usar, suero humano con conservantes; 0,001 UI/ml, 0,002 UI/ml, 0,005 UI/ml, 0,01 UI/ml, 0,02 UI/ml, 0,05 UI/ml (UI = unidades internacionales).
5. **Control IgG fuertemente positivo, 2 ml**, suero humano con conservantes, listo para usar
6. **Control IgG débilmente positivo, 2 ml**, suero humano con conservantes, listo para usar
7. **Conjugado IgG (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con estabilizadores de proteínas y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3,3',5,5'), 11ml**, lista para utilizar
9. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. Una vez separados los pocillos individuales necesarios conserve los restantes pocillos / tiras en la bolsa cerrada con desecante a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos deben volverse a guardar a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
2. El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.
3. Extraiga únicamente la cantidad de conjugado listo para utilizar o de TMB necesaria para la prueba. El exceso de conjugado o TMB extraído no debe devolverse, sino que debe ser desechado.

Material	Estado	Almacenamiento	Durabilidad
Muestras de análisis	diluidas	de +2 hasta +8°C	máx. 6h
	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Placa de microtitulación	tras la apertura	de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante)	3 meses
Absorbente del factor reumatoide	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	1 semana
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Tetrametilbencidina (TMB)	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Solución de parada	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como sueros patrón y de control sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todas las muestras, muestras diluidas, controles, conjugados y tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de parada de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Agua destilada/desionizada
2. Pipeta multicanal 50µl, 100µl
3. Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Tubos de ensayo
5. Servilletas de celulosa
6. Cubierta para placas ELISA
7. Recipientes para residuos infecciosos
8. Aparato de lavado manual para ELISA o aparato de lavado automático para placas de microtitulación
9. Espectrofotómetro para placas de microtitulación con filtro de 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)
10. Estufa de incubación

7. Realización de la prueba

El cumplimiento exacto de las instrucciones de VIROTECH Diagnostics es el requisito previo para obtener resultados correctos.

7.1 Material de muestra

Como material de análisis es posible utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el prospecto sólo se mencione el suero.

Las muestras de los pacientes se pueden almacenar durante 1 semana a 2-8°C.

Las diluciones de pacientes siempre deben prepararse frescas. Plazo de caducidad: máximo 6 h a 2-8°C.

Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse. Evítese una descongelación repetida.

1. Sólo deben utilizarse sueros recientes no inactivados.
2. No deben emplearse muestras hiperlipémicas, hemolíticas o con contaminación microbiana ni sueros que presenten turbidez (riesgo de falsos positivos o negativos).

7.2 Preparación de los reactivos

El sistema de diagnóstico de VIROTECH Diagnostics ofrece una gran flexibilidad al permitir el uso de los mismos tampones de dilución y lavado, TMB, solución de paro de citrato y conjugado para todos los parámetros y lotes. **Los sueros patrón, así como los controles fuerte y débilmente positivos, están previstos exclusivamente para el kit de ensayo utilizado.** Por lo tanto, no deben utilizarse con otros lotes.

1. Seleccione una temperatura de 37°C en la estufa y cerciórese de que se ha alcanzado dicha temperatura antes de comenzar la incubación.
2. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
3. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.
4. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).

7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

1. Para cada prueba, pipetee 100µl del tampón de dilución listo para usar (valor cero), de los sueros patrón y de control listos para usar y de los sueros de paciente diluidos. Recomendamos realizar todas las preparaciones por duplicado (valor cero, sueros patrón, controles y sueros de paciente). Si para la evaluación del ensayo mediante el método de 4 parámetros se utiliza como control de calibración el estándar 0,01 UI/ml, será obligatoria una serie doble. Dilución de trabajo de los sueros de paciente: 1+100; p.ej. 10µl de suero + 1ml de tampón de dilución.
2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación a 37 °C (con cubierta) durante 30 min.
3. El periodo de incubación finaliza con 4 lavados utilizando cada vez 350-400µl de solución de lavado por cavidad. No deje solución de lavado en los pocillos: retire los últimos restos de líquido sacudiendo sobre una superficie de celulosa.
4. Pipetee en todas las cavidades 100µl del conjugado listo para utilizar.
5. Incubación de los conjugados: 30 min. a 37°C (con cubierta).
6. Finalización de la incubación de los conjugados con 4 lavados (véase el punto 3).
7. Pipetee en cada pocillo 100µl de la solución de sustrato TMB lista para utilizar.
8. Incubación de la solución de sustrato: 30 minutos a 37°C (con cubierta, en la oscuridad).
9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada pocillo 50µl de la solución de parada de citrato. Agite cuidadosamente la placa hasta que los líquidos se hayan mezclado por completo y pueda verse un color amarillo uniforme.
10. Mida la absorbancia a 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm). Ajuste el fotómetro de modo que se reste el valor obtenido para el valor cero de todos los demás valores de absorbancia. La medición fotométrica debe realizarse en la hora siguiente a la adición de la solución de paro.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página

7.4 Empleo de procesadores ELISA

Todas las pruebas ELISA de VIROTECH Diagnostics pueden realizarse con ayuda de procesadores ELISA. El usuario está obligado a validar periódicamente el aparato.

VIROTECH Diagnostics recomienda el siguiente procedimiento:

1. Al instalar el aparato, o en caso de reparaciones importantes de su procesador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomienda validarlo según las instrucciones del fabricante.
2. Se recomienda comprobar seguidamente el procesador ELISA con el kit de validación (EC250.00). Esta comprobación periódica con el kit de validación debe realizarse al menos una vez al trimestre.
3. En cada ciclo de prueba deben cumplirse los criterios de autorización del certificado de control de calidad del producto. Este modo de procedimiento garantiza la función impecable de su procesador ELISA, sirviendo además para el aseguramiento de calidad del laboratorio.

8. Valoración del ensayo

8.1 Control del funcionamiento del ensayo:

- a) Valores de densidad óptica
El valor de densidad óptica correspondiente al valor cero debe ser inferior a 0,15.
Los valores DO del estándar mínimo (0,001 UI/ml) deben ser superiores al valor DO indicado en el certificado de control de calidad y los valores DO del estándar máximo (0,050 UI/ml) deben ser inferiores al valor DO indicado en el certificado de control de calidad.
- b) La concentración determinada para los controles débil y fuertemente positivo debe hallarse dentro de la zona de referencia (UI/ml) indicada en el certificado de control de calidad.
- c) Si no se cumplen los requisitos (valores DO, UI/ml), se deberá repetir el ensayo.

8.2 Valoración

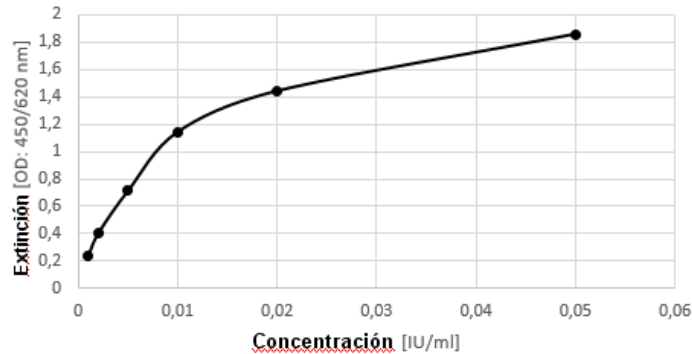
Con ayuda de los sueros patrón incluidos se elabora sobre el papel milimetrado semilogarítmico que se adjunta una curva patrón para calcular el contenido de anticuerpos IgG contra la toxoide tetánica existente en el suero. Para ello se marcan los valores medios de la extinción de los dos sueros patrón en el eje de ordenadas (eje y), y las concentraciones (UI/ml de los patrones listos para usar) en el eje de abscisas (eje x). Téngase en cuenta que los sueros de paciente se han diluido en proporción 1:100 para la realización de la prueba. Por ello se debe multiplicar por 100 el resultado obtenido del diagrama. Para crear la curva estándar puede seleccionar un cálculo de curva punto por punto o un cálculo de curva de 4 parámetros.

Atención:

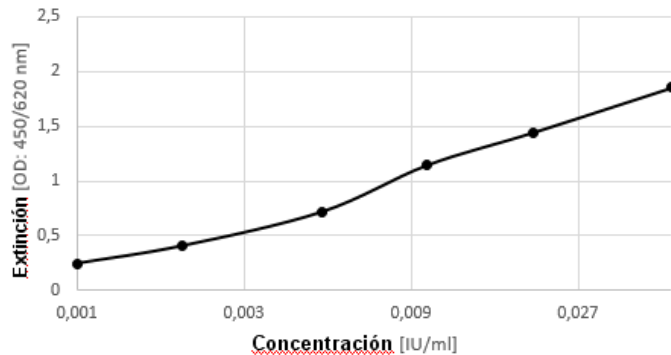
Las muestras cuya concentración por UI/ml es inferior a 0,1 UI/ml se pueden utilizar en una nueva preparación de ensayo con una dilución de 1:10. Esta diferencia de dilución se deberá tener en cuenta durante la evaluación.

Las muestras cuyos valores de extinción sean mayores que los del suero patrón de 0,05 UI/ml deben diluirse más para la prueba, p.ej. 1:200, 1:400 etc. Con valores de DO superiores a 2,00, la precisión de medición disminuye conforme aumenta la densidad óptica. Por ello se recomienda utilizar durante el análisis diluciones mayores (de p. ej. 1:200, 1:400, etc.) para los sueros que con una dilución de 1:100 alcanzan valores de DO superiores a 2,0. Esta mayor dilución debe tenerse en cuenta en la valoración.

Ejemplo de una curva patrón para tétano - lin/lin



Ejemplo de una curva patrón para tétano - lin/log



8.3 Interpretación

De acuerdo con las normas de la OMS, las concentraciones de anticuerpos contra la toxoide tetánica se expresan en unidades internacionales (UI/ml). Si el nivel de anticuerpos IgG contra la toxoide tetánica es superior a 0,1 UI/ml se considera que existe protección inmunitaria (2, 11) o protección inmunitaria segura (9,10). Las vacunaciones de recuerdo no están indicadas con concentraciones de anticuerpos superiores a 0,5 UI/ml (10). A continuación deseamos hacer las siguientes recomendaciones sobre la vacunación. Estas se han elaborado según las recomendaciones del grupo de trabajo de profilaxis inmunológica (13):

UI/ml	Interpretación y procedimiento ulterior
< 0,01	- la vacuna no inmuniza - en función de la anamnesis es necesaria una inmunización básica o una vacunación de recuerdo - control serológico entre 4 y 8 semanas después

0,01 – 0,1	- inmunidad por vacunación dudosa - es necesaria una vacunación de recuerdo - control serológico entre 4 y 8 semanas después
0,11 – 0,5	- todavía se dispone brevemente de inmunidad por vacunación - se recomienda una vacunación de recuerdo - la vacunación de recuerdo produce una inmunidad a largo plazo
0,51 – 1,0	- existe inmunidad por vacunación - se recomienda una vacunación de recuerdo o un control serológico a los 3 años - Nota: Las vacunaciones en el caso de concentraciones de anticuerpos superiores a 0,5 UI/ml pueden provocar reacciones indeseadas frente a la vacuna
> 1,0 – 5,0	- la vacunación proporciona inmunidad a largo plazo - se recomienda una vacunación de recuerdo o un control serológico como muy pronto a los 5 años
> 5,0 – 10,0	- la vacunación proporciona inmunidad a largo plazo - se recomienda una vacunación de recuerdo o un control serológico como muy pronto a los 8 años
> 10	- la vacunación proporciona inmunidad a largo plazo - se recomienda una vacunación de recuerdo o un control serológico como muy pronto a los 10 años

8.4 Limitaciones del ensayo

1. La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y los otros resultados analíticos que puedan existir.
2. La prueba ELISA Tétano de VIROTECH no es adecuada para el diagnóstico en laboratorio de una infección.
3. Para interpretar el título de antitoxoide también debe utilizarse la tarjeta de vacunación o la información sobre la última vacunación antitetánica (7).
4. No se recomienda una interpretación de concentraciones de antitoxoide inferiores a 0,1 UI/ml, ya que se hallan por debajo del límite de sensibilidad técnicamente reproducible al utilizar un sistema de prueba ELISA. Por ello, en ese caso hay que guiarse por el historial de vacunación del paciente para determinar si debe realizarse una inmunización básica o una vacunación de recuerdo.

9. Evaluación del ensayo IgG mediante el método de 4 parámetros

Existe la posibilidad de realizar con el análisis IgG ELISA para Tétano de VIROTECH una determinación cuantitativa mediante el método de 4 parámetros. Como control de calibración se utiliza en este caso el patrón de 0,01 UI/ml. El control de calibración compensa las variaciones causadas por la realización del ensayo. Para el cálculo se utilizan los valores medios de los valores OD.

9.1 Control del funcionamiento del ensayo

a) Valores OD

El valor OD del valor en blanco debe ser <0,15.

El valor OD del control de calibración debe encontrarse en el rango indicado en el certificado de control de calidad.

b) UI/ml

Las concentraciones de IgG anti- Tétano (UI/ml) del control débilmente positivo y del control fuertemente positivo deben encontrarse en los rangos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen los requisitos (valores OD, UI/ml), se deberá repetir el ensayo.

9.2 Conversión de los resultados cuantitativos en unidades internacionales por mililitro (UI/ml)

La extinción del valor en blanco (450/620 nm) se debe sustraer de todas las extinciones.

La cuantificación de los sueros de los pacientes se realiza mediante la adaptación a las unidades internacionales. Mediante ensayos exhaustivos se determina la curva estándar por medio de la regresión no lineal y se describe matemáticamente mediante la fórmula siguiente (12):

$$IU/ml = \exp(-(\ln((D-A)/((OD \text{ corr})-A)-1)-B)/C)$$

Siendo

- A: la OD esperada con una concentración de IgG anti- Tétano de 0
B: el factor de pendiente
C: el punto de inflexión
D: la OD esperada con una concentración infinita de IgG anti- Tétano
OD corr: la OD corregida del suero del paciente

Para tener en cuenta las variaciones durante el procesamiento del ensayo se corrige la OD medida del suero del paciente mediante un control de calibración:

$$OD \text{ corr} = OD \text{ suero del paciente} * \frac{OD \text{ control de calibración valor predeterminado}}{OD \text{ control de calibración medido}}$$

Encontrará los valores de los parámetros A, B, C y D, así como el valor predeterminado para la OD del control de calibración en el certificado.

Para un software de evaluación no compatible con este método de cálculo se definen en el certificado adicionalmente 6 parejas de valores estándar que también describen la curva estándar.

El rango cuantificable se encuentra entre 0,01 UI/ml y 15 UI/ml.

Determinación de las UI/ml

La determinación de las UI/ml se puede realizar mediante un software que podrá adquirir de VIROTECH. Como alternativa podemos proporcionarle una plantilla de evaluación para las hojas de cálculo usuales. Las concentraciones calculadas indican siempre las concentraciones reales del suero no diluido si este se ha diluido en el análisis a 1:100. Si un suero se ha analizado con una dilución diferente, las concentraciones deberán convertirse consecuentemente.

10. Literatura

1. Epidemiologisches Bulletin, 27/2002
2. Stark K, Schonfeld C, Barg J, Molz B, Vornwald A, Bienzle U, Seroprevalence and determinants of diphtheria, tetanus and poliomyelitis antibodies among adults in Berlin, Germany, Vaccine 17(7-8): 844-50 (1999)
3. Pietsch M et.al. , Influence of information campaigns on the vaccination immunity among the population of a small town area – seroepidemiological results of the „Wittlich Vaccination Study“; Gesundheitswesen 64 (1): 60-4 (2002)
4. Epidemiologisches Bulletin, 7/2002
5. Epidemiologisches Bulletin, 19/1999
6. Epidemiologisches Bulletin, 40/1998
7. Epidemiologisches Bulletin, 28/2001
8. Epidemiologisches Bulletin, 23/1999
9. Werner, G. T., et. al., Tetanusimmunität im Alter, Zeitschrift für Gerontologie, 16, 130-133 (1983)
10. Müller, H. E. et al., Tetanus-Schutzimpfung-Indikation und Kontraindikation, Dtsch. med. Wsch. 113 (1988), 1326-1328
11. Schröder, J. P. et al., Vermeidung hyperergischer Reaktionen bei Tetanus-Impfungen durch Einsatz eines wissenschaftsbasierten Systems bei Fragen der Impfnötigkeit, Klin. Lab. 1992, 38:229-233
12. Plikaytis et al., Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate Neisseria meningitidis Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 1991, J Clin Microbiol, 29, p1439-1446
13. Arbeitskreis Immunprophylaxe, Koordinator M. Pietsch: Infektionsschutz durch Impfprophylaxe, Storck Medien & Verlag KG, Bruchsal 1999

Preparación de las muestras de paciente y la solución de lavado

▼ **Solución de lavado:** Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro

▼ **Dilución del Muestras IgG**
1:101

p.ej.

10 µl de suero/plasma + 1000 µl de tampón de dilución

(El tampón de dilución para suero está listo para utilizar)

Realización de la prueba

