INTERÉS CLÍNICO

El tétanos es una enfermedad aguda que suele ser mortal. Es causada por una exotoxina del *Clostridium tetani* que provoca rigidez muscular generalizada y espasmos compulsivos de los músculos esqueléticos (1).
La mortalidad disminuye considerablemente cuando se administra en fecha temprana un antisuero específico. La antitoxina tetánica de suero equino fue muy utilizada con este fin, pero como todo antisuero de origen animal, da lugar a respuestas inmunitarias que provocan la eliminación rápida de las moléculas neutralizantes de la circulación del receptor, por lo que para obtener un efecto protector debe inyectarse una elevada cantidad de antisuero. Esta desventaja no ocurre cuando se utiliza antitoxina tetánica humana, cuyas dosis son mucho menores, sin contar que se ahorran las reacciones anafilácticas provocadas por el suero equino (1).
El UMELISA TETANUS es un juego de reactivos diseñado para la selección de donantes con alto título de antitoxina tetánica para la producción de gamma globulina hiperinmune (2,3). Debe ser utilizado con el Sistema Ultramicroanalítico (**SUMA**), adecuado para efectuar la prueba en óptimas condiciones y garantizando el empleo del equipamiento necesario.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA TETANUS es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo de tipo indirecto en el cual los anticuerpos antitoxina tetánica de la clase IgG presentes en la muestra se fijan al antígeno vacunal Toxoide Tetánico que reviste las placas de ultramicroELISA (4).
Después de eliminar por lavado los componentes no fijados se añade un conjugado Anti IgG humana/Fosfatasa Alcalina (F.A.) que se une a los anticuerpos fijados en la reacción anterior. Un nuevo lavado de las placas elimina el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorigénico (4-Metilumbeliferil fosfato), éste será hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será proporcional a la concentración de anticuerpos presente en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO
Código UM 2010 (192 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	2
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Suero de Carnero	1 x 22 mL
R3: Suero Estándar *	1 x Liofilizado
R4: Suero Control	1 x Liofilizado
R5: Conjugado	1 x 5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 ml

* Calibrado frente al patrón de referencia internacional TE-3 de la OMS.
El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.
Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.
El Suero Estándar y el Suero Control fueron negativos a las pruebas de detección de anti-VIH 1+2, anti-HBsAg, anti-VHC y Sífilis.

Preparación de las soluciones de trabajo:
R1: Para una tira de reacción diluya 1 mL de solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.
R2: Diluya 1:10 con solución de trabajo R1. Para 1 mL de solución R1 añada 0,1 mL de R2.
R3: Reconstituya con 1 mL de solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle suavemente.
R4: Reconstituya con 1 mL de solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle suavemente.
R5: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL
R6: Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 ºC. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.
Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las placas de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses de 2 a 8 ºC en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

-Agua destilada.
-Hipoclorito de sodio.
-Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
-Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
-Probetas graduadas entre 10 y 250 mL
-Incubadora a 37 ± 1°C.
-Papel absorbente.

PRECAUCIONES

- El UMELISA TETANUS está diseñado para la detección de anticuerpos antitoxina tetánica en suero humano; la realización de la prueba con otros fluidos biológicos (naturales o procesados) puede producir resultados erróneos. Los sueros a utilizar deben ser preferentemente frescos, sin precipitados, coágulos o células sanguíneas, los materiales insolubles deben extraerse por centrifugación antes de realizar la prueba. Se recomienda evitar la reiterada congelación y descongelación de las muestras.
- Manipule las muestras, el Suero Estándar y el Suero Control como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables.
- Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con las muestras como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los correspondientes manuales de usuario.
- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos una vez preparados según las especificaciones técnicas, estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Las placas de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.
- Tome todas las precauciones para **evitar la neutralización del conjugado** que puede producirse con material contaminado con suero humano.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
- Evite contaminaciones por materiales fluorescentes.
- El juego de reactivos no se debe emplear después de la fecha de vencimiento.
- Los reactivos del UMELISA TETANUS de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.-Preparación de la Curva Estándar, el Suero Control y las muestras.

Curva Estándar:

R3f: 0,0500 UI/mL: El Suero Estándar R3 reconstituido
R3e: 0,0250 UI/mL: 0,2 mL de 0,0500 UI/mL + 0,2 mL de R2
R3d: 0,0125 UI/mL: 0,2 mL de 0,0250 UI/mL + 0,2 mL de R2
R3c: 0,00625 UI/mL: 0,2 mL de 0,0125 UI/mL + 0,2 mL de R2
R3b: 0,003125 UI/mL: 0,2 mL de 0,00625 UI/mL + 0,2 mL de R2
R3a: 0 UI/mL: Solución de trabajo R2.

La Curva Estándar preparada a partir del componente R3: Suero Estándar, es estable durante dos meses almacenada de 2 a 8 ºC.

Suero Control:

El componente R4: Suero Control, una vez reconstituido queda listo para el uso.

Muestras:

Diluya los sueros 1:400 con solución de trabajo R2 al menos 10 minutos antes de transferirlos a la placa de reacción**.**

Dilución a: 10 µL de muestra + 90 µL de solución de trabajo R2. Homogeneice.

Dilución b: 10 µL de **dilución a** + 390 µL de solución de trabajo R2. Homogeneice.

2.-Adición de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras a las placas de reacción.

Añada 10 µL de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras previamente diluidas (**dilución b**).

Se seguirá el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3a	R3e	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	R3a	R3e	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	R3b	R3f	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	R3b	R3f	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	R3c	R4	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	R3c	R4	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	R3d	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	R3d	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Los Sueros Estándares y el Suero Control deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA TETANUS para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.-Incubación de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras.

Incube las placas de reacción durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4.-Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las placas de reacción cuatro veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las placas sobre papel absorbente.

5.-Adición del conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras de reacción utilizadas y depósitelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de las placas de reacción.

6.-Incubación del conjugado.

Incube las placas de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7.-Lavado.

Lave las placas de reacción según se describe en el acápite 4.

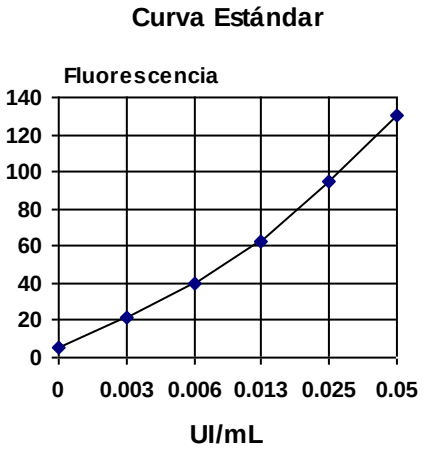
8.-Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo. Si utiliza lectores que necesitan posiciones en las tiras de reacción para el ajuste de 0 y 100, debe exceptuar las posiciones A1 y B1.

9.-Incubación del sustrato.
Incube en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Normalmente se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 115 a 160 unidades para el Suero Estándar de 0,0500 UI/mL (R3f), sin embargo, debido a las variaciones de temperatura puede resultar conveniente que cada laboratorio ajuste el tiempo de incubación para lograr estos niveles de fluorescencia.
10.-Lectura.
Si utiliza lectores que requieren posiciones de ajuste de 0 y 100, dispense en A1 10 µL de agua destilada y en B1 10 µL de la Solución Fluorescente de Referencia (SFR) diluida 1:10 con agua destilada. Realice la lectura utilizando un lector de la serie SUMA.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

Los valores de fluorescencia de las muestras de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra el logaritmo de la concentración de anticuerpos correspondientes a la Curva Estándar. Entre el Suero Estándar R3a y el R3b se utiliza una escala lineal-lineal. Este procedimiento es realizado automáticamente por el lector SUMA.



La validación, interpretación e impresión de los resultados, son realizados automáticamente por el programa UMELISA TETANUS. Si no dispone del mismo, para el cálculo de la concentración real, debe multiplicar el valor de concentración obtenido al interpolar en el gráfico por el factor de dilución.

CONTROL DE LA CALIDAD

I- La Curva Estándar debe cumplir la siguiente condición:
La media de los dos valores de fluorescencia para cada Suero Estándar (R3a-R3f) deben proporcionar un incremento de fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado. Los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.
II- El valor de concentración calculado para el Suero Control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El resultado expresa la concentración en suero de anticuerpos antitoxina tetánica de la clase IgG en UI/mL. Con la dilución de las muestras 1:400 se puede cuantificar hasta 20 UI/mL. Si los niveles de antitoxina tetánica son superiores a 20 UI/mL se recomiendan diluciones adicionales no mayores a una dilución 1:4000.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

1. PRECISIÓN.

Se evaluaron tres muestras de diferentes concentraciones de antitoxina tetánica en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante tres días (interensayo).

Precisión del UMELISA TETANUS

Fluorescencia	Intraensayo (n=16)		Interensayo (n=48)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
91,3	2,8	3,3	5,7	6,3
76	2,5	4,5	6,5	8,5
54,9	2,9	5,8	5,1	9,2

DE: Desviación Estándar. CV: Coeficiente de Variación.

2. EXACTITUD.

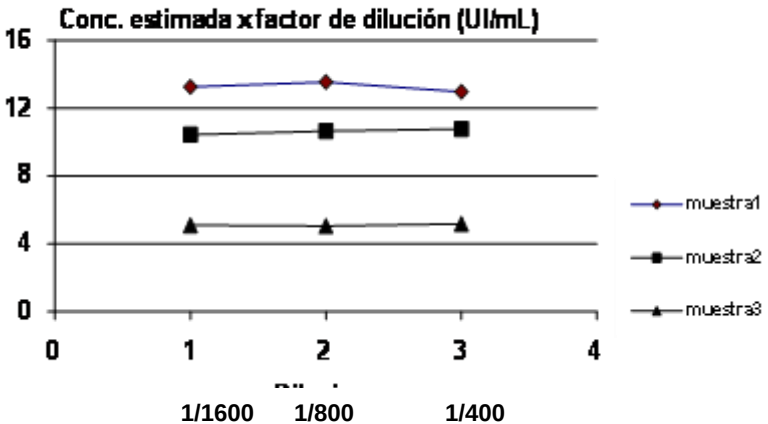
Con la adición de diferentes cantidades de antitoxina tetánica a un suero humano de concentración conocida se obtuvo como promedió 96,10 ± 4,91 % de recuperación.

Recuperación del UMELISA TETANUS

Muestras	Valor Esperado (UI/mL)	Valor Obtenido (UI/mL)	Recuperación (%)
1	3,07	3,08	100,3
2	6,77	6,14	90,7
3	12,95	12,60	97,3

Paralelismo del UMELISA TETANUS

Se realizaron diluciones seriadas a muestras de pacientes con altos niveles de antitoxina tetánica. El cálculo del coeficiente de variación de los valores de concentración una vez corregidos por el factor de dilución fue inferior al 10 %.



3. DETECTABILIDAD.

La detectabilidad del UMELISA TETANUS es de 0,5 UI/mL. Se definió como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente al Suero Estándar R3a + 2 D.E.

BIBLIOGRAFÍA

1.-El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Publicación científica No. 538, Organización Panamericana de la Salud, 1992.
2.-Fajardo, E. et al.: UltramicroELISA para medir antitoxina tetánica en suero humano. Bol. of Sanit. Panam. 119 (2), 1995.
3.-Fajardo, E. et al.: Aplicación del método ultramicroELISA en el banco de sangre para el pesquisaje de plasma antitetánico con vistas a la producción de la inmunoglobulina específica. Ciencias Farmacéuticas 87, La Habana, Cuba, 29-31 Octubre, 1987.
4.-Fernández, J.L.: Desarrollo de micrométodos de inmunoanálisis para el diagnóstico (Tesis de doctorado). La Habana: Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ministerio de Educación Superior, 1980.

Noviembre 17, 2003

UMELISA TETANUS
Código UM 2010
Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave.25, Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA.
Teléfono: 2082929 Télex: 512439, Fax: (537)2086514.