

## ARTICULOS ORIGINALES

**Influencia de la temperatura, tiempo de conservación y valor absoluto de las muestras de suero en los resultados de la cuantificación de antitoxina tetánica**

**Influence of temperature, time of conservation, and absolute value of serum samples in quantification results of tetanus antitoxin**

**Dr. Lázaro Mena López\*;** **Dr. Ciro Núñez Mesa\*\*;** **Dra. Nancy Pérez Cabarco\*\*;**  
**Dr. José Fernández Estrada\***

\* *Banco Provincial de Sangre*

\*\* *Planta de Hemoderivados*

### RESUMEN

Se evaluó la precisión y exactitud del KIT UMELISA en la dosificación de IgG antitetanos. Se estudió la variabilidad de la concentración de anticuerpos en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento en 34 donantes especiales de plasma hiperinmune antitetánico, inmunizados con la vacuna toxoide tetánica, de producción nacional, y sometidos a procedimientos de donación por plasmaféresis automatizada. Se escogieron dos grupos de estudio según la concentración de inmunoglobulinas séricas (< 10 UI/ml y > 10 UI/ml) y se trabajó con muestras conservadas a 30 °C y de 2 a 8 °C. Los test estadísticos utilizados en el procesamiento de la información arrojaron que la técnica es precisa y exacta, y que las mayores fluctuaciones ocurren cuando los títulos eran bajos y la conservación a temperatura entre 2 y 8 °C.

**DeCS:** ANTITOXINA TETÁNICA; ANÁLISIS CUANTITATIVO; CONSERVACIÓN DE LA SANGRE

## **ABSTRACT**

Precision and accuracy of UMELISA kit in IgG tetanus antitoxin dosification was assessed. Concentration variability of antibodies was studied according to time and storage temperature in 34 special donors of tetanus antitoxin hyperimmune plasma immunized with tetanus antitoxin vaccine of national production and was subjected to procedures of donation for automated plasmapheresis. Two study group were chosen as to serum immunoglobulin concentration (<10 UI/ml and >10 UI/ml) and were worked with preserved samples at -30 °C and of 2-8 °C. Statistic test used in the processing of information showed that the technique was precise and accurate and that greater fluctuations occur when titles are low and the conservation is at 2-8 °C.

**DeCS:** TETANUS ANTITOXIN; QUANTITATIVE ANALYSIS; BLOOD PRESERVATION

## **INTRODUCCIÓN**

En nuestro país comienza a desarrollarse desde 1996 la obtención de plasma hiperinmune antitetánico a partir de donantes seleccionados con altos títulos de anticuerpos, destinados a la producción de gammaglobulina antitetánica de origen humano. Este mismo año el Banco Provincial de Sangre de Camagüey se incorpora al programa utilizando el procedimiento ético e inocuo de plasmaféresis <sup>1, 5</sup> productiva automatizada en personas previamente inmunizadas con la vacuna toxoide tetánica. <sup>3</sup>

El monitoraje del título de anticuerpos antitetánicos por la tecnología SUMA permite valorar evolutivamente la respuesta humoral de los donantes y obtener de esta forma un plasma de calidad óptima para la producción de inyectables. <sup>2, 4, 6</sup>

En el presente trabajo se realiza una evaluación de la precisión y exactitud de la técnica UMELISA en la determinación de IgG antitetanos en suero humano; además, se determina la influencia del valor absoluto de las muestras en los resultados obtenidos, así como el tiempo y la temperatura de conservación desde la toma de la muestra hasta la realización del ensayo.

## MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo y longitudinal donde se escogió aleatoriamente un grupo de donantes especiales de plasma hiperinmune antitetánico (n=34) y se agrupó en dos, uno con concentraciones inferiores a 10 UI/ml y otro con concentraciones mayores de 10 UI/ml; ambos se subdividieron en otros dos, uno con muestras conservadas de 2 a 8 °C y el otro conservado a -30 °C en alícuotas que fueron descongeladas durante el procedimiento sólo una vez. Los cuatro grupos fueron estudiados a la vez en una misma placa del kit UMELISA Tetanus durante cinco semanas consecutivas. A las muestras agrupadas se les calculó la media (X) y la desviación de las diferencias de la medias mediante el paquete Microstat, y teniendo en cuenta la temperatura de almacenamiento, concentración y momento de ejecución de la prueba para establecer si las diferencias eran estadísticamente significativas con un nivel de significación  $\alpha < = 0,05$ .

Además, dos muestras, una con concentraciones menores de 10 UI/ml y otra con concentraciones mayores de 10 UI/ml, ambas conservadas a -30 °C, se probaron 50 veces cada una en cinco ocasiones diferentes, lo que estableció los valores máximo y mínimo, la media (X), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variaciones (CV). El estudio se realizó con el kit UMELISA Tetanus el cual es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo de tipo indirecto,<sup>6</sup> producido y estandarizado por el Centro de Inmunoensayo de Ciudad Habana.

Las muestras de suero fueron diluidas a 1:400 con suero de carnero al 50 % y se colocaron 10  $\mu$ l de esta dilución en las tiras de reacción conjuntamente con una curva estándar preparada a partir de un suero control de 50 UI/ml de concentración, luego se incubaron durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda. A continuación se efectuaron cuatro ciclos de lavado con solución tampón de tricloruro de sodio-tween 20 con el lavador automático de placas MAS-201, después se añadieron 10  $\mu$ l de conjugado anti IgG/ Fosfatasa alcalina en cada uno de los posillos de reacción y se incubó nuevamente 30 min a 37 °C; posteriormente se lavaron las placas en cuatro ocasiones y se añadió sustrato fluorogénico, dejándolo incubar a temperatura ambiente hasta lograr una fluorescencia del quinto punto de la curva entre 100-150 U. Finalmente se realizó la lectura en un equipo PR 521 de la tecnología SUMA del Centro de Inmunoensayo. Todo el trabajo lo realizó un mismo analista en iguales condiciones de laboratorio.

## RESULTADOS

Se tomó aleatoriamente de la tabla 1 la muestra # 199 con una concentración inicial de 6.3 UI/ml (<10 UI/ml) y conservada a -30 °C. El test de titulación fue realizado 50 veces en cinco oportunidades diferentes, por lo que se obtuvo un valor mínimo de 4 UI/ml, un máximo de 9,7 UI/ml, la media de 5,76 UI/ml, la DE de 1, 18 y el coeficiente de variación de 20, 49 %. Con estos resultados y aceptando que cualquier determinación reiterada de la misma muestra, con un 95 % de probabilidades, caería en el rango de la media más o menos dos DE, se obtiene una variabilidad permisible de 4, 72 UI/ml en un rango que oscila de 3, 40 a 8, 12 UI/ml.

Se tomaron los primeros 25 valores para calcular la X y DE. Se obtuvieron los valores siguientes:

$X=5,97$   $DE=1,23$

Éstos son similares a los obtenidos analizando las 50 determinaciones. Con ellos se confeccionó una carta de precisión y se plotearon los resultados de las últimas 25 determinaciones. Se obtuvo que 18 están entre la media más o menos una DE, 6 caen entre uno y dos DE y una sola determinación cae más allá de dos DE, por lo que podemos decir que aún cuando el CV fue elevado se logró buena precisión en los resultados, con un ligero cambio de exactitud a causa de la ubicación de la mayoría de los valores entre la X y menos una DE (Fig. 1).

### Concentración Ig Anti Tetanus (UI/ml)

#### Determinaciones

##### Fig. 1. Resultado de 25 determinaciones

Se siguió igual procedimiento con las muestras de concentraciones con más de 10 UI/ml tomando de éstas la # 233, cuya concentración inicial fue de 18, 0 UI/ml y su estudio dio una X de 15, 6 UI/ml, una DE de 1, 50 y un CV de 9, 62.

El análisis de esta muestra arroja una variabilidad de 6 UI/ml con límites de confianza de  $\pm 2$  DE, que oscilaría de 12, 6 a 18, 6 UI/ml.

Se tomaron los primeros 25 valores de los test realizados, se alcanzó una X de 15, 58 y una DE de 1,36. Se confeccionó la carta de precisión (Fig. 2) donde se ubicaron los 25 valores restantes, se observó que casi todos los resultados estuvieron alrededor de la X en el límite de  $\pm$  una DE; y solamente siete valores entre una y dos DE y dos casos más allá de DE. La exactitud y precisión son buenas, al obtenerse mejores resultados que con la muestra # 199 (<10 UI/ml), a pesar de que la variabilidad es mayor con un rango de 6 UI/ml.

## **Concentración Ig Anti Tetanus (UI/ml)**

### **Determinaciones**

#### **Fig. 2. Carta de precisión con las 25 determinaciones restantes**

Por otro lado, las 34 muestras seleccionadas para el estudio fueron chequeadas durante cinco semanas consecutivas, todas a la vez en la misma placa de reacción. Los valores de las 17 muestras de concentración menor de 10 UI/ml fueron conservadas de 2 a 8 °C y a -30 °C, respectivamente (tabla 1).

**Tabla 1. Valoración de la repetibilidad del UMELISA Tetanus  
en muestras con concentraciones menores de 10 UI/ml**

Muestras	Conservadas de 2 a 8 °C					Conservadas a 30 °C				
	Semanas					Semanas				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>172</b>	7,3	7,8	6,2	9,3	7,1	4,6	7,2	5,9	7,6	6,3
<b>173</b>	6,3	6,3	5,7	6,3	4,6	5,1	5,6	4,5	5,3	4,6
<b>177</b>	8,4	9,6	8,5	10,2	7,0	7,2	6,7	5,6	6,8	6,1
<b>186</b>	7,5	10,5	7,7	8,4	6,8	6,7	7,1	6,4	5,3	7,3
<b>187</b>	9,5	10,9	8,5	8,4	7,3	7,9	9,4	7,6	8,2	6,2
<b>197</b>	7,9	7,5	6,1	6,7	5,7	5,6	6,6	7,4	8,3	6,8
<b>199</b>	7,0	9,7	7,6	7,3	6,6	6,3	6,9	6,4	6,2	5,5
<b>202</b>	6,0	7,3	6,9	8,7	5,9	7,6	7,3	6,2	6,9	8,9
<b>204</b>	6,1	7,8	6,5	7,8	7,9	5,8	7,0	7,0	8,2	6,1
<b>213</b>	8,0	8,1	7,2	8,5	6,9	8,1	8,1	7,2	9,5	8,5
<b>2</b>	5,4	7,1	6,6	7,1	4,9	5,7	5,9	5,0	5,7	4,7
<b>6</b>	6,5	8,8	7,5	6,3	6,2	6,7	7,2	5,6	6,7	5,0
<b>10</b>	8,0	8,8	8,7	8,0	6,5	7,9	8,8	7,4	7,9	6,7
<b>214</b>	5,5	5,7	7,3	5,9	5,5	5,7	6,2	4,7	5,1	3,7
<b>223</b>	8,0	8,7	8,5	8,3	7,8	6,4	8,7	7,4	8,2	6,4
<b>231</b>	7,2	7,7	8,0	6,7	7,5	6,4	6,7	6,4	8,4	5,3
<b>245</b>	8,4	8,4	6,8	7,2	7,0	8,8	9,5	9,8	8,8	6,7
<b>MAX</b>	9,5	10,9	8,7	10,2	7,9	8,8	9,5	9,8	9,5	8,9
<b>MIN</b>	5,4	5,7	5,7	5,9	4,6	4,6	5,6	4,5	5,1	3,9
<b>X</b>	7,24	8,28	7,31	7,71	6,54	6,60	7,35	6,50	7,24	6,19
<b>DE</b>	1,13	1,38	0,92	1,17	0,96	1,16	1,16	1,30	1,36	1,30

A cada grupo de valores se le determinó la media y desviación estándar y se aplicó el test de hipótesis de comparación de las diferencias de las medidas para determinar si había concordancia en los resultados o si existían diferencias significativas entre los grupos.

En el análisis se encontró que en las muestras almacenadas de 2 a 8 °C hubo diferencias significativas para un nivel de  $\alpha \leq 0,05$ , entre la primera y segunda, así como entre la primera y quinta determinaciones.

En las muestras congeladas a -30 °C se encontraron diferencias significativas entre la primera y segunda. Al comparar los resultados de la muestra conservadas de 2 a 8 °C con aquellas conservadas a -30 °C, hubo diferencias significativas en las determinaciones de la segunda y tercera semanas. En el resto del estudio realizado no hubo diferencias significativas.

En cuanto a las 17 muestras escogidas con concentraciones iniciales mayores de 10 UI/ml (tabla 2) se les aplicó el mismo procedimiento estadístico, se encontraron diferencias significativas entre la primera y segunda y entre la primera y cuarta determinaciones en aquellos conservadores de 2-8 °C. No se detectaron diferencias significativas en el grupo de muestras con concentraciones mayores de 10 UI/ml conservadas en congelación a -30 °C.



Por último, al comparar los resultados de las muestras conservadas de 2 a 8 °C y a -30 °C, con concentraciones mayores de 10 UI/ml, tampoco se observaron diferencias significativas.

## **DISCUSIÓN**

De todo este trabajo podemos decir que, a pesar de lo referido inicialmente, el UMELISA Tetanus como juego de reactivos para la selección de donantes con alto título de antitoxina tetánica <sup>5</sup> tiene exactitud y precisión cuando se repite una muestra un número determinado de veces, la variabilidad del método, dentro de los límites de confianza, hace que cuando se estudian grupos de muestras de forma repetida se produzcan en ocasiones diferencias significativas entre los resultados, los que se ven más frecuentemente en muestras con concentraciones bajas, independientemente del tiempo de almacenamiento de la muestra en el término de cinco semanas en que se realiza el estudio.

Por otro lado, la temperatura de conservación también parece influir, pues mayores diferencias se ven en aquellas muestras conservadas de 2 a 8 °C.

En las conservadas a -30 °C sólo hay diferencias significativas entre la primera y segunda determinaciones en el grupo con concentraciones inferiores a 10 UI/ml, que a nuestro juicio no es dependiente de la técnica en cuestión. Finalmente, el valor absoluto de los resultados de la pesquisa es muy importante. En el grupo en que la concentración es mayor de 10 UI/ml no se observan diferencias significativas al comparar los resultados de las conservadas de 2 a 8°C con respecto a las conservadas a -30 °C durante las cinco semanas de duración del estudio, que debe ser la temperatura de conservación de las muestras del programa hasta tanto sean pesquisados.

La realización de los pesquisas por duplicado y tomando el valor medio o por triplicado, y la mediana como valor real, ayudaría a mejorar esta situación.

De igual forma, el establecimiento de un programa de control externo de la calidad en UMELISA Tetanus, permitirá conocer la calidad del trabajo de los laboratorios y monitorear la marcha del programa.

## **CONCLUSIONES**

1. El Kit UMELISA Tetanus brinda una buena exactitud y precisión en los resultados obtenidos.
2. Las muestras con concentraciones mayores de 10 UI/ml muestran mejor precisión.
3. La temperatura óptima de conservación de las muestras previas al ensayo es de -30°C.
4. El tiempo de conservación de las muestras hasta la realización del ensayo en el término de cinco semanas que duró el estudio no influye de forma significativa en los resultados obtenidos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. OMS. Plasmaféresis e inmunización de donantes. Toma, fraccionamiento, inspección de la calidad y usos de la sangre y de los productos sanguíneos. Ginebra: OMS; 1982.
2. Harnaut J, Fenieres P, Golder A, Guemver P, Avenard G. Detection of antitetanic antibodies: techniques (electrosyneresis, laurell, latex) applied to a high antibody population. Rev Fr Transfus Immunohematol. 1978;21(4):981-90.
3. Eyquem A, Turpin A, Raynaud M. Production of antitetanic human gammaglobulins with the aid of a vaccine absorbed on calcium phosphate. Rev Fr Transfus Immunohematol. 1970;13(1):47-60.
4. Fajardo EM, Fernández JL, Solís RL, Portuondo B, Heredia L, Noroña M, et al. Ultramicro ELISA para medir antitoxina tetánica en suero humano. Bol of Sanit Panam. 1995;119(2):19-122.
5. Hamerschlak N, Nobrega JL. Aféresis. Bol Soc Bras Hematol-hemoter. 1986;8(141):210-6.
6. Umelisa tetanus para la determinación de anticuerpos IgG al toxoide tetánico: código UM 2010. La Habana: Centro de Inmunoensayo; 1996.

Recibido: 23 de marzo de 2002

Aprobado: 12 de abril de 2002

*Dr. Lázaro Mena López.* Licenciado en Bioquímica. Banco Provincial de Sangre.  
Camagüey, Cuba.