

anti-HBs

Prueba ELISA para la detección de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) en suero o plasma

Presentación del estuche

REF ⁷	51255	96 Tests	Estuche Completo
IVD			

Uso esperado

La Hepatitis viral es una enfermedad infecciosa causada la mayoría de las veces por el virus de la Hepatitis B (HBV), la cual afecta aproximadamente al 5 % de la población mundial con algunas variaciones regionales. La enfermedad puede manifestarse como asintomática, aguda (con casos fulminantes y mortales), o hepatitis crónica con posible degeneración a cirrosis y/o carcinoma hepatocelular y muerte.

La enfermedad es usualmente transmitida a través del intercambio de fluidos corporales entre individuos infectados y sanos. La vía de transmisión puede ser parenteral (suero infectado, hemoderivados, transfusiones sanguíneas), o no-parenteral (saliva, lágrimas, sudor, orina, semen, grasa corporal, etc.).

El conocimiento de la presencia o ausencia de anticuerpos (anti-HBs) contra el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B puede ser útil para evaluar la inmunidad o recuperación clínica del individuo infectado con HBV. La desaparición del HBsAg y la aparición de anti-HBs en suero refleja que el individuo está en la etapa final de la recuperación de la infección viral. Anticuerpos anti-HBs pueden permanecer en el suero por años, lo que en determinado nivel puede proveer protección inmunológica adecuada contra la reinfección por el virus de la Hepatitis B.

Principio

El análisis anti-HBs es un inmunoensayo enzimático en fase sólida que utiliza un método sandwich para detectar anticuerpos anti-HBs en suero o plasma.

La muestra y el conjugado HBsAg - Peroxidasa se agregan a los micropozos recubiertos con HBsAg purificado. La cantidad de conjugado HBsAg-Peroxidasa unido al micropozo es proporcional a la concentración de anti-HBs en la muestra, la cual actúa como un enlace entre el HBsAg fijado al micropozo y el conjugado HBsAg-HRP. Después de la incubación el conjugado enzimático no unido es eliminado por lavado. Se agrega solución Substrato y durante otra incubación se desarrolla un color azul. La intensidad de este color, el cual cambia a amarillo luego de detener la reacción adicionando solución ácida, es proporcional a la cantidad de anti-HBs presente en la muestra. Entre ciertos límites, la densidad óptica a 450 nm (OD_{450}) refleja el nivel de anticuerpos anti-HBs en la muestra. Una lectura de OD_{450} inferior al valor del punto de corte (cut-off value) se considera negativa para anti-HBs. Una lectura de OD_{450} igual o mayor que el valor del punto de corte se considera reactiva para anti-HBs.

Reactivos y Contenidos

MIC	12	Tiras de Micropozos Tiras rompibles de 8 pozos, recubiertas con HBsAg (Humano)	
CON	7,0 ml	Conjugado Enzimático (tapadeno negro) Conjugado HBsAg - Peroxidasa del rábano picante Coloreado amarillo HRP / Buffer Tris / HCl	pH 7,0 ± 0,1 0,1 mol/l
SA	10 ml	Reactivo A Substrato (tapadeno blanca) Peróxido de Hidrógeno Buffer Citrato	pH 5,1 ± 0,2 0,03 % 0,06 mol/l
SB	10 ml	Reactivo B Substrato (tapadeno negro) 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina DMSO	0,6 mg/ml 0,7 mol/l
NC	1,6 ml	Control Negativo (tapadeno amarilla) Suero humano normal libre de marcadores de la Hepatitis B	
PC	1,1 ml	Control Positivo (tapadeno roja) Anti-HBs (humano) en solución buffer Buffer Tris / HCl	0,4 IU/ml 0,1 mol/l
STOP	12 ml	Solución de Parada (tapadeno blanca) Acido Sulfúrico (R36/38), ✱, irritante	1 mol/l

WS	52 ml	Solución de Lavado (tapadeno negro) concentrado para 600 ml Buffer Fosfato Salino Tween 20	pH 6,5 ± 1,0 1 mol/l 0,2 %
	1	Portaplaca Cintas adhesivas	

Los reactivos contienen los siguientes preservativos :

0,01 % Timerosal en	CON , NC , PC
0,003 % Gentamicina en	CON , NC , PC

Precauciones

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con ojos, piel y membranas mucosas. Usar ropa protectora y guantes desechables.

Todas las muestras de pacientes y los controles deben ser manejados como potencialmente infecciosos. El control negativo ha sido analizado como negativo para marcadores de Hepatitis B. Ambos controles son negativos para anticuerpos anti-HIV y anti-HCV. Adicionalmente el control positivo se ha inactivado por calor.

Todos los materiales contaminados con muestras o controles deben ser inactivados en autoclave (60 minutos a 121°C) o por inmersión en solución de hipoclorito de sodio (5 %) durante 60 minutos.

STOP irrita los ojos y la piel. En contacto con los ojos, enjuagar vigorosamente con abundante agua y consultar al médico.

No mezclar o utilizar componentes de estuches de reactivos con diferentes números de lote. No mezclar ni confundir las tapas.

No usar reactivos después de su fecha de vencimiento

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento si son almacenados de 2...8°C.

Preparación de Reactivos

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (15...25°C) antes de su empleo.

Reactivos que no estén en uso siempre deben ser almacenados de 2...8°C.

Solución de trabajo substrato **SUB**

Se pueden pipetear 50 µl de **SA** y 50 µl **SB**, ó también es posible trabajar con una **SUB**. Preparar la **SUB** mezclando volúmenes iguales de **SA** y **SB** en la cantidad necesaria (100 µl por pozo). Usar solamente un envase plástico limpio previamente enjuagado con agua destilada o desionizada. **SUB** es estable por 2 horas almacenada a temperatura ambiente, protegida de la luz.

Solución de Lavado **WASH**

Diluir **WS** 1 + 20 con agua destilada o desionizada fresca, por e.j. 30 ml **WS** + 600 ml agua.

Estabilidad: 1 semana de 2...8°C evitando la contaminación

Tiras de Micropozos ELISA **MIC**

Las tiras están empacadas al vacío en una bolsa plástica con un desecante. Antes de abrir, las tiras deben estar a temperatura ambiente para evitar la condensación en los pozos y la bolsa. Devolver las tiras no utilizadas al empaque con el desecante y resellar. Mantener el adhesivo intacto.

Las tiras almacenadas de esta forma y de 2...8°C pueden ser usadas en un lapso de tres meses.

No tocar el borde superior o el fondo de los pozos con los dedos.

Muestra

Suero o plasma (EDTA, Heparina, Oxalato)

Las muestras pueden conservarse 7 días de 2...8°C, o 30 días a -20°C. Congelar y descongelar sólo una vez. Muestras descongeladas deben ser homogenizadas. Eliminar partículas por centrifugación o filtración.

Procedimiento

Seguir el procedimiento exactamente como se describe.

Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente antes del uso. Al comenzar el análisis deberían registrarse las muestras y controles en la hoja provista con el estuche para este fin. Seleccionar el número requerido de **MIC** y colocarlos en el portaplaca.

Asegurarse de una correcta transferencia de calor durante los 60 minutos de incubación a 37°C. Poner los micropozos sobre un papel absorbente húmedo y precalentado en el termoblock del incubador.

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y absorbancias falsamente elevadas. Evitar la luz directa durante el desarrollo de color.

Cada etapa de pipeteo debe ser seguida por una suave agitación de los micropozos para asegurar un buen mezclado evitando salpicar las soluciones. Remover burbujas de aire antes de las incubaciones y antes de las lecturas de absorbancia.

Etapa 1

1. Pipetear en todos los pozos **excepto A1**
50 µl [NC] en B1/C1/D1
50 µl [PC] en E1/F1
50 µl muestras en pozos remanentes
2. 50 µl [CON] en cada pozo **excepto A1**
3. Mezclar la muestra y el [CON] agitando con cuidado el porta micropozos por 20 segundos. Si es posible, utilizar un agitador de placas, (por ejemplo HUMAREADER). Tener cuidado de no salpicar el contenido de un micropozo a otro.
4. Cubrir [MIC] con el autoadhesivo.
5. Incubar
60 minutos a 37°C
6. Aspirar y eliminar el contenido de los pozos en una solución de hipoclorito de sodio 5 % y agregar a cada micropozo
400 µl [WASH]
Después de aproximadamente 30 segundos de enjuague, aspirar de nuevo y eliminar repitiendo este lavado 5 veces.
Purgar lavadores automáticos con [WASH] y lavar [MIC] por 6 veces. Asegurarse de que el lavador llene todos los pozos completamente y elimine el contenido eficientemente después de cada 30 segundos. (remanente: < 15 µl).
Remover líquido remanente invirtiendo los pozos sobre papel absorbente.

Etapa 2

1. Dispensar (ver también [SUB])
50 µl [SA] y
50 µl [SB] en todos los pozos **incluyendo A1**.
2. Mezclar e incubar
30 min. a temperatura ambiente (15...25°C) protegido de la luz intensa.
3. Dispensar
100 µl [STOP] en cada pozo y mezclar cuidadosamente.
4. Medir la absorbancia antes de 30 minutos contra blanco A1 a
450 nm usando un filtro de referencia de 630-690 nm (si está disponible).

Validación de la Prueba

Los resultados del test son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

1. Valor promedio Control Negativo: MNC < 0,200.
2. Valor promedio Control Positivo: MPC > 0,500.
3. MPC - MNC ≥ 0,300.

Si la diferencia es menor, debe sospecharse técnica inapropiada. El análisis debería repetirse. Si la diferencia es consistentemente menor que 0,300, puede sospecharse deterioro de los reactivos.

4. Valores individuales de Control Negativo deberían ser 0,5 x MNC y 2,0 x MNC. Si un valor está fuera de este rango, descartar este valor y recalcular el MNC. Si dos valores están fuera de rango, la prueba debe repetirse.
 $NC_i = 0,5 \times MNC < MNC < 2,0 \times MNC$

Cálculo

La presencia o ausencia de anti-HBs se determina por comparación del valor de absorbancia de la muestra con el valor del punto de corte (cut-off). El valor del punto de corte se calcula a partir de los controles negativos :

$$\text{Valor del Punto de Corte (Cut-off Value) COV} = \text{MNC} + 0,025$$

Interpretación de Resultados

1. **Positivo:** Muestras con valores de absorbancia iguales o mayores que 1,1 x COV (Valor del Punto de Corte) de consideraran como anti-HBs positivo por el criterio del test.
2. **Negativo:** Muestras con un valor de absorbancia menor que 0,9 x COV se consideran como anti-HBs negativas (o no-reactivas).
3. **Equivoco:** Muestras con valores de absorbancia entre ± 10 % del valor de corte deben ser reanalizadas para confirmar la lectura original.

Limitaciones del Procedimiento

1. El sistema ELISA anti-HBs se limita a la detección y semicuantificación de anticuerpos anti-HBs en suero o plasma.
2. Como con todos los análisis de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no puede basarse en los resultados de una sola prueba, sino que debería ser producto de una evaluación médica frente a los hallazgos clínicos y de laboratorio.
3. Tal como con otros sensibles análisis ELISA con micropozos, pueden obtenerse lecturas inconsistentes debido a lavados inadecuados. Por ello es importante aspirar los micropozos completamente, antes de agregar solución de lavado o reactivos.

Características de la ejecución

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía www.human.de/data/gb/vr/EL-A-HBS.pdf ó www.human-de.com/data/gb/vr/EL-A-HBS.pdf

Referencias

1. Hollinger, F. *et al.*, Assay of Australia antigen and antibody employing double antibody and Solidphase Radioimmunoassay Technique and comparison with the Passive Hemagglutination Methods, *J. Immunol.* **107**, 1099 (1971)
2. Lander, J. *et al.*, Viral Hepatitis Type B. (MS-2 Strain). Detection of Antibody after Primary Injection, *New Eng. J. Med.* 285-303 (1971).
3. Polesky, H.F., Olson, C., The incidence and significance of antibody to Australia antigen in blood donors, *Am. J. Clin. Pathol.* **56**, 129 (1971)
4. Ginsberg, A.L. *et al.*, Antibody to Australia antigen: Detection with a simple radioimmunoassay, incidence in military populations and role in the prevention of hepatitis B with gamma globulin, *J. Lab Clin. Med.* **82**, 317 - 325 (1973)
5. Lander, J.J. *et al.*, Antibody to Hepatitis-associated antigen, *JAMA* **220**, 1079-1082 (1972)
6. Yuasa, T. *et al.*, Hepatitis B antigen and antibody prevalence of Japanese sera selected from the 1972 year's collection at National Serum Bank, National Institute of Health of Japan. *Japan. J. Med Sci. Biol.* **34**, 181 - 190 (1981)
7. ISO 15223 Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied

EL-A-HBS
INF 5125501 E
11-2001-7



Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 - D-65205 Wiesbaden - Germany
Telefon: +49 6122 9988 0 - Telefax: +49 6122 9988 100 - eMail: human@human.de