

HBsAg

Prueba ELISA para la Detección del antígeno HBs en Suero o Plasma Humano

Tamaño del Kit

[REF] ⁹	51048	96 Pruebas	Kit Completo
[IVD]			

Utilidad

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

La enfermedad es usualmente transmitida por intercambio de fluidos corporales entre personas sanas y la infectada. La patología de la transmisión es a través de vía parenteral (suero infectado, productos sanguíneos, transfusiones sanguíneas, etc.) o no-parenteral (saliva, lagrimas, sudor, orina, semen, heridas en la piel, etc.).

El monitoreo básico para evaluar la infección de HBV es para determinar la presencia del antígeno de superficie del HBV (HBsAg) en suero. La presencia del HBsAg da una indicación de ser un portador del HBV y la posibilidad de ser infeccioso. La determinación final del estado infeccioso de una persona infectada es posible cuando se realiza la prueba de HBsAg en conjunto con los otros marcadores del HBV como el HBeAg/anti-HBe, anti-HBc y el anti-HBs.

Principio

La prueba de HBsAg esta basada en un ensayo tipo sandwich en los micropozos cubiertos con anticuerpos monoclonales de ratón (acr) contra HBsAg.

La muestra reacciona simultaneamente con los acr inmovilizados y con los anticuerpos policlonales anti-HBs (cobayo) conjugados con peroxidasa de rábano. Si el HBsAg esta presente en la muestra, el complejo conteniendo peroxidase es capturado en la superficie de los micropozos. Luego de la incubación el conjugado no unido es removido por el lavado. La solución de substrato es agregada y durante la posterior incubación se desarrolla un color azul. La intensidad de color, la cual cambia a amarillo luego de parar la reacción con una solución ácida, es proporcional a la cantidad de HBsAg en la muestra.

Con ciertos límites, la densidad óptica a 450 nm (OD₄₅₀) refleja la cantidad del antígeno de superficie del HBV en la muestra. Una lectura de OD₄₅₀ menor del cut-off es considerada negativa para el HBsAg. Una lectura igual o mayor de OD₄₅₀ que el cut-off es considerada reactiva para HBsAg. Muestras que dan repetidamente lecturas reactivas para este método son consideradas positivas para la presencia de HBsAg. Estas muestras deben ser confirmadas por una prueba confirmatoria.

Reactivos y Contenidos

[MIC]	12	Tiras de Micropozos Tiras de 8 pocillos, recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-HBs (ratón)
[CON]	7,0 ml	Conjugado Enzimático (tapadeno negro) Anti-HBs (cobayo) conjugado de pH 8,1 ± 0,1 peroxidasa de rábano peroxidase conjugate, <u>coloreado rojo</u> Buffer Tris / HCl 0,1 mol/l
[SA]	10 ml	Substrato reactivo A (tapadeno blanco) pH 5,1 ± 0,2 Peroxido de Hidrógeno 0,03 % Buffer de Citrato 0,06 mol/l
[SB]	10 ml	Substrato reactivo B (tapadeno negro) 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina 0,6 mg/ml DMSO 0,7 mol/l
[NC]	1,6 ml	Control Negativo (tapadeno amarilla) Suero humano libre de marcadores de Hepatitis B
[PC]	1,1 ml	Control Positivo (tapadeno roja) Suero Diluido HBsAg positivo, inactivado
[STOP]	12 ml	Solución de parada (tapadeno blanca) Acido Sulfurico 1,0 mol/l (R36/38), ✖, irritante

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

Los siguientes preservantes estan contenidos en los reactivos:

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

Notas de Seguridad

No huela los reactivos. Evite el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Use bata y guantes descartables.

Todas las muestras de los pacientes y los controles controles deben ser manejados como si fuesen capaces de transmitir la infección. El control negativo ha sido encontrado negativo para marcadores de Hepatitis B. Ambos controles han sido encontrados negativos para anticuerpos anti-HIV y anti-HCV. Adicionalmente el control positivo ha sido inactivado por calor.

Todos los materiales contaminados con muestras de los pacientes y los controles del kit deben ser inactivados por autoclaveado (60 min. a 121°C) o en una solución de hipoclorito de sodio hipoclorito (5%) por al menos 60 min.

[STOP] irrita los ojos y la piel. Si entra en contacto con los ojos, enjuague con abundante agua y consulte al médico.

No mezcle o use componentes de kits con diferentes numeros de lote.

No mezcle las tapaderas de los viales.

No use reactivos luego de la fecha de expiración.

No use reactivos de otros fabricantes con esta prueba.

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta la fecha de expiración en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Preparación de reactivos

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

Reactivos que no se usen deben estar almacenados a 2...8°C.

Solución substrato de trabajo **[SUB]**

En lugar de pipetear 50 µl de **[SA]** y **[SB]** es posible trabajar con una **[SUB]**. Para preparar la **[SUB]** se combinan volúmenes iguales del **[SA]** y **[SB]** en las cantidades necesarias (100 µl por pozo). Use solamente viales plásticos limpios previamente enjuagado con agua destilada o desionizada. **[SUB]** es estable por 2 h si se almacena a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Solución de lavado **[WASH]**

Diluya **[WS]** 1 + 20 con agua desmineralizada fresca, libre de microorganismos, e.j. 30 ml **[WS]** + 600 ml agua.

Estabilidad: 1 semana a 2...8°C asegúrese que se evite la contaminación.

Tiras de Micropozos **[MIC]**

Las tiras estan cubiertas con una laminilla y selladas en una bolsa plastica con un desecante. Antes de abrir, las tiras deben estar a temperatura ambiente para evitar la condensación en los pozos y la bolsa. Regrese las tiras no usadas a la bolsa con desecante, saque todo el aire posible y reselle cuidadosamente con cinta adhesiva y regresela a 2...8°C. Mantenga el sellante adhesivo intacto.

Las tiras almacenadas en esta forma a 2...8°C pueden usarse en un periodo de tres meses.

No toque la parte superior e inferior de los pozos con los dedos.

Muestra

Suero o plasma (EDTA, Heparina, Oxalato)

Las muestras pueden almacenarse por 7 días a 2...8°C, y por 30 días a -20°C. Congele y descongele solamente una vez. La muestra descongelada debe homogenizarse. Elimine cualquier sedimento por centrifugación o filtración.

Procedimiento de la Prueba

Siga el procedimiento exactamente como se describe.

Lleve todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente antes de usar. Cuando comience la prueba todas las muestras y controles deben ser cuidadosamente rotulados. Seleccione el numero requerido de **[MIC]** y colóquelos firmemente en el marco para pozos .

Tenga el cuidado de calentar durante los 80 min. de incubación a 37°C. Coloque los micropozos en una toalla húmeda precalentada o en un bloque de metal en el incubador.

El procedimiento de lavado es crítico. Un insuficiente lavado puede resultar en poca precisión y falsa absorbancia elevada.

Evite luz directa durante el desarrollo de color.

Cada paso de pipeteo debe ser seguido por un suave golpeteo en el marco de micropozos para asegurar la adecuada mezcla sin que salpiquen las soluciones. Burbujas de aire deben ser removidas antes de las incubaciones para obtener buenas lecturas de absorbancia.

Paso 1

1. Pipetee en todos los pozos **excepto A1**
50 µl **[NC]** en B1/C1/D1
50 µl **[PC]** en E1/F1
50 µl Muestras en los siguientes pozos
2. 50 µl **[CON]** en cada pozo **excepto A1**
3. Mezcle la muestra y el **[CON]** con leves golpes al marco de pozos durante 20 segundos. Si se cuenta con un agitador de placas (e.j. HUMAREADER), tenga el cuidado de que no se mezcle el contenido de un pozo con el de la par.
4. Cubra **[MIC]** con cinta adhesiva.
5. Incube a 37°C.
6. 80 min. aspire los contenidos de los pozos en una solución al 5% de hipoclorito de sodio y agregue a cada pozo 400 µl **[WASH]**
Luego de 30 sec. de enjuague aspire completamente y repita estos lavados 5 veces.
Si tiene lavador automatico llene **[WASH]** y lleve a cabo el procedimiento 6 veces. Asegurese que el lavador llena completamente **[MIC]** y aspire todo después de 30 seg. (líquido remanente: < 15µl).
Remueva el líquido remanente invirtiendo el plato sobre un papel absorbente.

Paso 2

1. Dispense (vea también **[SUB]**)
50 µl **[SA]** y
50 µl **[SB]** en todos los pozos **incluyendo A1**.
2. Mezcle e incube 30 min. temperatura ambiente (15...25°C) protegida de luz directa.
3. Dispense 100 µl **[STOP]** en cada pozo y mezcle cuidadosamente.
4. Mida la absorbancia entre los siguientes 30 min. contra el blanco en A1 a 450 nm usando como longitud de onda diferencial a 630-690 nm (si esta disponible).

Validación de la prueba

Los resultados de la prueba son validos si cumplen los siguientes criterios:

1. Media del Control negativo: MNC < 0,100.
2. Media del Control positivo: MPC > 0,600.
3. MPC - MNC ≥ 0,500.

Si la diferencia es menor, una tecnica inadecuada pudo ser la razón. La prueba debe ser repetida. Si la diferencia es consistentemente menor que 0,500, deterioro de los reactivos se sospecharia.

4. Valores en los individual de NC deben estar entre 0,5 x MNC y 2 x MNC. Si un valor esta fuera de rango, descate este valor y recalculé la MNC. Si dos valores estan fuera de rango, la prueba debe ser repetida.

$$NC_i = 0,5 \times MNC < MNC < 2 \times MNC$$

Calculos

La presencia o ausencia de HBsAg es determinada por comparación de los valores de absorbancia de la muestra contra el valor del cut-off. El valor del cut-off es calculado con el control negativo :

$$\text{Valor de Cut-off COV} = \text{MNC} + 0,025$$

Interpretación de Resultados

1. **Positivo:** Muestras con valores de absorbancia iguales o mayores que el valor del cut-off son considerados reactivas al HBsAg por el criterio de la prueba. Si la muestra es reactiva al repetirla se considera positiva.
2. **Negativo:** Muestras con valores de absorbancia menores que el valor del cut-off son consideradas negativas a HBsAg (o no reactiva).
3. **Dudosa:** Muestras con valores de absorbancia entre ±10% del valor del cut-off deben ser reprobadas para confirmar la lectura original.

Limitaciones del Procedimiento

1. La prueba ELISA de HBsAg esta limitada a la detección y semi-cuantificación del HBsAg en suero, plasma, o plasma recalcificado.
2. Como toda prueba diagnostica, un diagnostico clinico definitivo no debe basarse en el resultado de una sola prueba, y debe hacerse unicamente por el médico luego de que los hallazgos clinicos y de laboratorio han sido evaluados.
3. Como toda prueba sensible de micropozos, inconsistentes lecturas pueden obtenerse debido a un inadecuado lavado. Por lo tanto es importante aspirar completamente los pozos antes de agregar la solución de lavado o los reactivos.
4. La interpretación del estatus de la infección (aguda, cronica, temprana o tardía, o transportador) es solamente posible con la determinación de los marcadores adicionales de la hepatitis B (HBc, HBe, anticuerpos especificos).

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-HBSAG.pdf ó www.human-de.com/data/gb/vr/EL-HBSAG.pdf

Referencias

1. Magnius, L.O. *et al.*, A new antigen-antibody system. Clinical significance in long-term carrier of hepatitis B surface antigen, J. Am. Med. Assoc. **231**, 356-359 (1975)
2. Rubin, E., Acute and Chronic Viral Hepatitis, Federation Proceedings **38** (13): 2665-2673 (1979)
3. Aach R.D. *et al.*, Detection of Australia Antigen by Radioimmunoassay, Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A. **68**, 1056 (1971)
4. Kim, C.Y., Tilles, J.G., Purification and Biophysical Characterization of Hepatitis Antigen, J. Clin. Invest. **52**, 1176-1186 (1973)
5. Ling, C.M., Radioimmunoassay for Hepatitis B Virus Markers, Manual of Clinical Immunology, Rose, N. and Friedman, H., editors
6. Caldwell, C.W., Barret, J.T., Enzyme Immunoassay for Hepatitis B and its Comparison to other Methods, Clin. Chim. Acta **81**, 305 (1977)
7. Wolters, G., *et al.*, Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Hepatitis B Surface Antigen, J. Infect. Dis. **136**, 311 (1977)
8. Darrell, L. *et al.*, Structure of Hepatitis B Surface Antigen, J. Biol. Chem. **257**, 10414-10420 (1982)
9. ISO 15223 Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied

EL-HBSAG
INF 5104801 E
11-2001-5



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