



Hepatitis B (HBsAg)

ELISA

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) de 3ª generación para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg)

SIGNIFICACION CLINICA

La hepatitis B es una enfermedad viral caracterizada por un período prolongado de incubación (45-160 días). El virus causante de esta patología (HBV) es una partícula compuesta por una región interior o "core" donde se encuentra el DNA y una envoltura exterior antigénica conocida como antígeno de superficie (HBsAg). Su presencia en el suero indica enfermedad activa. El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y su correspondiente anticuerpo son específicos para infecciones por virus B. El antígeno puede ser detectado en el suero y secreciones de pacientes en período agudo o en infecciones crónicas por HBV.

El HBsAg es generalmente la primera evidencia de infección por HBV, que puede preceder en semanas o meses a cualquier otra manifestación de laboratorio o a los síntomas y signos clínicos de la enfermedad. Puede ser en algunos casos el único indicador de portadores asintomáticos en individuos con hepatitis B crónica.

La detección del HBsAg es importante por lo tanto, no sólo para el diagnóstico de la enfermedad aguda, sino para el control de portadores en bancos de sangre, unidades de diálisis y áreas hospitalarias donde exista la posibilidad de transmisión de la infección.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La muestra se pone en contacto con un anticuerpo monoclonal anti-HBs inmovilizado sobre el soporte sólido. Si la misma contiene antígeno HBsAg, éste formará un complejo con los anticuerpos y permanecerá unido al soporte. La fracción no unida se elimina por lavado tras lo que se agrega otro anticuerpo monoclonal anti-HBs conjugado con peroxidasa. Si se produjo la reacción en la primera etapa del proceso, se unirá el conjugado. Luego de un nuevo lavado se agrega el sustrato enzimático. En los casos en que el HBsAg esté presente en la muestra, habrá desarrollo de color celeste. La reacción se detiene con el agregado de ácido sulfúrico, con lo que el color celeste vira al amarillo.

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removibles con pocillos que contienen anticuerpo monoclonal anti-HBs inmovilizado.

Conjugado concentrado: anticuerpo monoclonal anti-HBs conjugado con peroxidasa.

Diluyente de Conjugado: buffer Tris conteniendo aditivos y conservantes.

Revelador A: peróxido de hidrógeno 60 mmol/l en buffer citrato 50 mmol/l.

Revelador B: tetrametilbencidina (TMB) 0,01 mol/l en ácido clorhídrico 0,1 N.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado concentrado: cloruro de sodio 1,4 mol/l en buffer fosfatos 100 mmol/l y tensioactivo no iónico 0,1 g/l.

Control Positivo: dilución de suero inactivado, reactivo para HBsAg.

Control Negativo: dilución de suero inactivado, no reactivo.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Buffer de Lavado: a baja temperatura los componentes del reactivo pueden cristalizar. En tal caso, antes de diluir, colocar en baño de agua a 37°C unos minutos, mezclando luego por inversión. Para usar diluir 1+4 con agua destilada (1 parte de Buffer de Lavado concentrado + 4 partes de agua destilada).

Policubeta sensibilizada: lista para usar.

Conjugado: antes de diluir, para optimizar el aprovechamiento del reactivo, es conveniente centrifugar suavemente el Conjugado concentrado para arrastrar lo que pudiera quedar retenido en las paredes del tubo. Preparar diluyendo 1 parte de Conjugado concentrado + 50 partes de Diluyente de Conjugado (ej.: para una tira colocar 20 ul Conjugado concentrado + 1 ml Diluyente de Conjugado o cantidades equivalentes).

Revelador A y B: listos para usar.

Stopper: listo para usar.

Control Positivo y Negativo: listos para usar.

PRECAUCIONES

- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Los controles se encuentran inactivados. Sin embargo, deben emplearse como si se tratara de material infeccioso.
- Los sueros controles han sido examinados para HIV encontrándose negativos.
- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. No usar baño de agua. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos u otras fuentes

entren en contacto con la policubeta, ya que éste afecta la reacción.

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Evitar contacto del ácido sulfúrico (Stopper) con piel y mucosas. R36/38: irrita los ojos y la piel. R34: provoca quemaduras. S24/25: evítese el contacto con los ojos y la piel. S26: en caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S28: en caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
- Evitar el derrame de líquidos y formación de aerosoles.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado: estable 3 meses a temperatura ambiente.

Policubeta sensibilizada: las tiras de pocillos con anticuerpo inmovilizado se proveen cerradas al vacío y con desecante. No abrir el envoltorio hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente, de lo contrario se favorecerá la humectación del contenido. Las tiras de pocillos no utilizadas deben conservarse dentro del sobre con el desecante, cerrado y a 2-10°C. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 5 meses posteriores mientras no se supere la fecha de vencimiento del equipo.

Conjugado: estable 24 horas en refrigerador (2-10°C).

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener la muestra de la manera usual. No pueden usarse muestras inactivadas por calor.

b) Aditivos: si se emplea plasma puede utilizarse cualquier anticoagulante de uso corriente en la práctica transfusional.

c) Sustancias interferentes conocidas: la hemólisis, hiperlipemia y otras causas de turbiedad pueden provocar resultados erróneos. Estas muestras deben ser clarificadas por centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: las muestras pueden conservarse durante 7 días a 2-10°C. Para conservación por períodos más prolongados deben ser congeladas a -20°C o menos. Evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados. Existen evidencias que muestran que los congelamientos sucesivos pueden ser causa de resultados erróneos.

Si las muestras deben ser transportadas, embalar de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de materiales infecciosos.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas capaces de medir los volúmenes indicados en el PROCEDIMIENTO.
- Reloj alarma o cronómetro.
- Estufa a 37°C.
- Material volumétrico adecuado.
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas (opcional).

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda primaria: 450 nm
- Longitud de onda secundaria (bicromática): 620-650 nm
- Calibración del instrumental: Llevar a cero el espectrofotómetro con Blanco de Reactivos procesándolo de la misma forma que una determinación pero omitiendo colocar Muestra y Conjugado, es decir sólo Revelador A, Revelador B y Stopper.
- Tiempo total de reacción: 2 horas 30 minutos.
- Temperatura de reacción: 37°C y temperatura ambiente.
- Volumen de muestra: 100 ul

PROCEDIMIENTO

Nota: una vez iniciado el procedimiento debe completarse sin interrupción.

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba. Procesar simultáneamente 2 Controles Positivos (CP), 3 Controles Negativos (CN) y los Desconocidos (D). En los pocillos a utilizar de la policubeta colocar:

	D	CP	CN
Muestra	100 ul	-	-
Control Positivo	-	100 ul	-
Control Negativo	-	-	100 ul

Para evitar la evaporación, cubrir la placa con una cinta autoadhesiva e incubar en estufa 60 minutos a 37°C. Luego aspirar cuidadosamente el líquido de cada pocillo recibiendo en un recipiente para desechos biológicos que contenga 5% de hipoclorito sódico. A continuación, lavar 5 veces con Buffer de Lavado empleando aproximadamente 350 ul/vez/pocillo. Después de cada lavado, el líquido se descartará también en el recipiente con hipoclorito, opcionalmente emplear lavador automático. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pocillos. Luego agregar en cada pocillo:

Conjugado	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Para evitar la evaporación, cubrir la placa con una cinta autoadhesiva e incubar durante 60 minutos en estufa a 37°C. Luego eliminar el líquido de los pocillos, recibiendo en el recipiente con hipoclorito y lavar según se indicó más arriba. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pocillos. Luego agregar:

Revelador A	1 gota	1 gota	1 gota
Revelador B	1 gota	1 gota	1 gota

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y luego agregar:

Stopper	1 gota	1 gota	1 gota
----------------	--------	--------	--------

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos.

Leer en espectrofotómetro a 450 nm o bicromática a 450/620-650 nm o evaluar el resultado a simple vista por comparación con los Controles Positivos y Negativos.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 30 minutos por lo que los resultados deben observarse dentro de ese lapso.

CRITERIOS DE VALIDACION DE LA CORRIDA

La corrida se considera válida si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

- Las lecturas de al menos 2 de los 3 Controles Negativos corregidas contra el Blanco de Reactivos deben ser menores o iguales a 0,150 D.O.
- La lectura media de los Controles Positivos corregida debe ser mayor o igual a 0,600 D.O.

Si alguna de estas condiciones no se cumple, repetir la corrida. Para ambos casos recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

a) Con instrumental óptico

La reactividad de la muestra se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor cut-off.

Cut-off = CN + 0,060 D.O.

donde CN = promedio de las lecturas del Control Negativo.

Muestras Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias mayores o iguales al valor cut-off.

Las muestras inicialmente reactivas deben analizarse nuevamente por duplicado con el mismo método antes de su interpretación definitiva. Si uno o ambos duplicados resultaran reactivos la muestra debe considerarse repetidamente reactiva.

Muestras no Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias menores que el valor cut-off.

b) Interpretación visual

Si se opta por este tipo de interpretación, debe considerarse no reactiva toda muestra que no presente una coloración mayor que la de los Controles Negativos. Por el contrario, una muestra netamente amarilla se considera reactiva. Colores tenues mayores que el del Control Negativo, requieren la interpretación instrumental.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Constituyen causas de resultados erróneos:

- Lavado incorrecto de los pocillos de reacción.
- Contaminación cruzada de Muestras no Reactivas con

antígeno procedente de una Muestra Reactiva.

- Contaminación de la solución cromogénica con agentes oxidantes (cloro, etc.).
- Contaminación del Stopper.
- Conservación inadecuada de las tiras de pocillos no utilizadas.
- Uso de baño de agua en lugar de estufa para la incubación.
- Contaminación del Buffer de Lavado diluido. Se recomienda verificar la limpieza de los recipientes donde se prepara y almacena. Si se observa aparición de turbidez o precipitado al prepararlo, debe desecharse.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por HBV.

Ocasionalmente, al efectuar lecturas bicromáticas, pueden obtenerse absorbancias negativas que no invalidan la determinación. Esto se debe a que algunas muestras dan lecturas inferiores al Blanco de Reactivos.

Verifique que el sistema lavador que está usando (WIENER WASHER u otro), aspire totalmente el contenido de los pocillos y que el volumen de la solución lavadora sea pareja.

PERFORMANCE

a) Sensibilidad: utilizando el International Standard for Hepatitis B Surface Antigen (subtype ad) NIBSC (cód. 80/549) diluido en PBS-BSA 5%, azida sódica 0,1% se detectan cantidades de antígeno de 0,5 UI/ml. De acuerdo al informe del WHO Working Group on International Reference Preparations, 1 UI equivale a 0,58 unidades PEI (Paul Ehrlich Institut) o 1,93 French "ng" o 5,59 Abbott "ng".

b) Especificidad: se realizaron diferentes estudios sobre una población de individuos hospitalizados y ambulatorios, provenientes de centros de salud de la ciudad de Rosario, Argentina. En los mismos se comparó la especificidad del método con otros de similar principio de reacción, obteniéndose los siguientes resultados:

- Estudio N° 1: se analizaron 85 individuos obteniéndose una especificidad de 100%.
- Estudio N° 2: se analizaron 76 individuos, obteniéndose una especificidad de 98,7%.
- Estudio N° 3: se analizaron 127 individuos, obteniéndose una especificidad de 100%.

c) Estudio poblacional: en una población general que incluye individuos sanos y donantes, la correlación con respecto a otros ensayos disponibles en el mercado, fue del 99,8%.

PRESENTACION

- Equipo para 96 determinaciones (Cód. 1483253).
- Equipo para 192 determinaciones (Cód. 1483256).

BIBLIOGRAFIA

- Wisdom, G.B. - Clin. Chem. 22/8:1243, 1976.
- Engvall, E. - Methods Enzymol. 70:419, 1980.
- Gerety, R.J. - "Hepatitis B" - Academic Press, Inc., USA, 1985.
- García Solís - Análisis Clínicos 24/6:199, 1981.
- Toplikar, E.; Carlomagno, A.; Capriotti, G.; Rojkin, F.; Lorenzo, L. - Rev. Arg. de Transfusión XVII/4:239, 1991.
- Rojkin, F.; Gariglio, R.; Toplikar, E.; Carlomagno, A.; Lorenzo, L. - Proceedings, 5th National Forum on AIDS, Hepatitis

and other Blood-Borne Diseases, Atlanta, Georgia, USA, pág. 89, 1992.

- Toplikar, E.; Carlomagno, A.; Rojkin, F.; Gariglio, R.; Lorenzo, L. - J. Clin. Lab. Anal. 7/6:324, 1993.
- Barbara, J. - Vox Sang. 65:249-250, 1993.
- WHO Working Group on International Reference Preparations for Testing Diagnostic Kits used in the Detection of HBsAg and anti-HCV Antibodies. Geneva, SW 6-7 October 2003.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta | **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

Diluyente | **Conj.**

Diluyente de Conjugado

Conjugado | **Conc.**

Conjugado Concentrado

Buf. Lavado | **Conc.**

Buffer de Lavado Concentrado

Revelador | **A**

Revelador A

Revelador | **B**

Revelador B

Control | **+**

Control Positivo

Control | **-**

Control Negativo

Stopper

Stopper

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

EC | **REP** Representante autorizado en la Comunidad Europea

IVD Uso diagnóstico "in vitro"

Contenido suficiente para <n> ensayos

Fecha de caducidad

Límite de temperatura (conservar a)

No congelar

Riesgo biológico

Volumen después de la reconstitución

Cont. Contenido

LOT Número de lote

Elaborado por:

Xn | Nocivo

Corrosivo / Caústico

Xi | Irritante

Consultar instrucciones de uso

Calibr. | Calibrador

CONTROL | Control

CONTROL | **+** | Control Positivo

CONTROL | **-** | Control Negativo

REF | Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert. N°: 4189/01



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina