
INTERÉS CLÍNICO

La aparición de los anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (anti-HBsAg), después de la infección viral y una vez que ha desaparecido el HBsAg, confiere inmunidad contra este virus. Esta inmunidad puede ser adquirida por vía natural o por inmunoprofilaxis activa, requiriéndose títulos de al menos 10 UI/L para ser considerados protectores (1-4).

El UMELISA ANTI-HBsAg es un juego de reactivos diseñado para la detección cuantitativa de anti-HBsAg en suero humano y puede ser de interés:

- 1.-Para investigar la inmunidad humoral frente al virus de la Hepatitis B (1-5).
- 2.-Para el pesquisaje de individuos preinmunizados (1,3,4).
- 3.-Para establecer la seroconversión después de la inmunización pasiva o activa (1,3,4).
- 4.-En el diagnóstico diferencial de enfermedades hepáticas (2,3).
- 5.-En el seguimiento de pacientes con Hepatitis B (2,3).
- 6.-Para la selección de donantes anti-HBsAg positivos para obtener inmunoglobulinas contra la Hepatitis B.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

La prueba se efectúa tomando como base una reacción inmunoenzimática donde el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), suministrado con los reactivos, reacciona con los anticuerpos monoclonales que recubren las tiras de ultramicroELISA, la unión del HBsAg se evidencia por la reacción sucesiva de un conjugado Anti-HBsAg/Fosfatasa Alcalina (F.A.) y un sustrato (4-Metilumbeliferil fosfato), cuya hidrólisis genera un producto fluorescente. Las muestras se preincuban con el HBsAg, si éstas contienen anticuerpos anti-HBsAg ellos bloquean los determinantes antigénicos del HBsAg, de manera que la reacción se inhibe y la reducción de la señal fluorescente será proporcional a la concentración de anti-HBsAg presente en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Código UM 2023 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Control Negativo	1 x 7,5 mL
R3: Suero Estándar *	1 x 2 mL
R4: Solución de HBsAg **	1 x 7,5 mL
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 MI

*El R3 contiene 50 ± 5 UI/L de anti-HBsAg, calibrado frente al patrón 26177 de la O.M.S.

**El R4 contiene 40 ± 5 UI/mL de HBsAg subtipo ad inactivado por tratamiento termoquímico, calibrado frente a la preparación internacional (IRP) 80/549 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, el Control Negativo y la Solución de HBsAg resultaron ser negativos a las pruebas de detección de anti-VIH 1+2, anti-VHC y Sífilis.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de solución R1 hasta 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R2: Listo para su uso.

R3: Listo para su uso.

R4: Listo para su uso.

R5: Listo para su 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 entre 2 y 8 °C. En esas 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 tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses entre 2 y 8 °C en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Papel absorbente.
- 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
- Placas de dilución o microtubos de reacción.
- Incubadora de 37 ± 1 °C.

PRECAUCIONES

-El UMEIISA ANTI-HBsAg está diseñado para la detección de anticuerpos al HBsAg en suero humano. Las muestras a utilizar deben ser preferentemente frescas, sin precipitados, coágulos o células sanguíneas, los materiales insolubles deben extraerse por centrifugación antes de realizar la prueba. Evite la reiterada congelación y descongelación de las muestras.

-Manipule las muestras, el Control Negativo, el Suero Estándar y la Solución de HBsAg como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables.

-Los materiales contaminados 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 manuales de usuario correspondientes.

-Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.

-Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarlas la cubierta protectora.

-Garantice el adecuado control de la humedad en todos los pasos de la prueba. Las muestras y reactivos, una vez aplicados, deben mantenerse en las cámaras húmedas para evitar su evaporación ya que esto puede alterar los resultados.

- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
- Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones.
- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Todas las fases de pipeteo deben llevarse a cabo con sumo cuidado y precisión. Evite salpicaduras.
- Use pipetas manuales de precisión para la aplicación de las muestras, el Suero Estándar, el Control Negativo, la Solución de HBsAg, el conjugado y el procedimiento de homogeneización. Si utiliza la multipipeta ERIZO para homogeneizar y transferir las muestras, debe lavar profusamente sus puntas con solución de trabajo R1 y agua destilada para evitar la contaminación.
- Siga de manera cuidadosa las instrucciones de utilización del equipo de lavado. Los lavados incompletos influyen negativamente en los resultados del ensayo.
- Utilice puntas y accesorios sin restos de agentes químicos susceptibles de desnaturalizar el HBsAg.
- Evite contaminaciones por materiales fluorescentes.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
- Los reactivos del UMELISA ANTI-HBsAg de lotes diferentes no se deben intercambiar.
- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

I. Preparación de la Curva Estándar y las muestras.

1.-Curva Estándar:

50 UI/L: Suero Estándar (R3).

25 UI/L: 0,05 mL de R3 + 0,05 mL de R2.

2.-Muestras:

Se analizarán sin dilución previa. Si se desea conocer la concentración de las muestras que exceden de 50 UI/L será necesario realizar diluciones utilizando como diluyente el Control Negativo suministrado con el juego de reactivos o un suero humano negativo a Anti-HBsAg y HBsAg. Homogeneice bien antes de la preincubación.

II. Preincubación con HBsAg.

- 1.-Distribuya 10 μ L de R4 en cada uno de los pocillos a utilizar de una cubeta de dilución o en microtubos de reacción.
- 2.-Añada 50 μ L de las muestras.
- 3.-Añada 50 μ L del Control Negativo (R2), 50 μ L del Estándar de 25 UI/L y 50 μ L del Estándar de 50 UI/L.
- 4.-Homogeneice suavemente la mezcla.
- 5.-Incuba a 37 °C durante 16-24 horas en una cámara húmeda equilibrada a igual temperatura.

III. Realización de la prueba.

1.-Adición de la mezcla a las tiras de reacción.

Homogeneice la mezcla preincubada según se describe en el acápite II.4. Transfiera 10 μL a las tiras de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de trabajo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	N	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	25	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	25	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	50	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	50	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

Para ambos esquemas los Sueros Estándares (25 y 50) y el Control Negativo (N), deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA ANTI-HBsAg 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.

2.-Incubación.

Incuba las tiras de reacción 2 horas a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

3.-Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción seis 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 tiras sobre papel absorbente.

4.-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 deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 μL del conjugado en cada pocillo de reacción.

5.-Incubación.

Incube las tiras de reacción 2 horas a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

6.-Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite III.3.

7.-Adición del sustrato.

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

8.-Incubación.

Incube 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

9.-Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de los resultados y su impresión son realizados automáticamente por el programa UMELISA ANTI-HBsAg.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

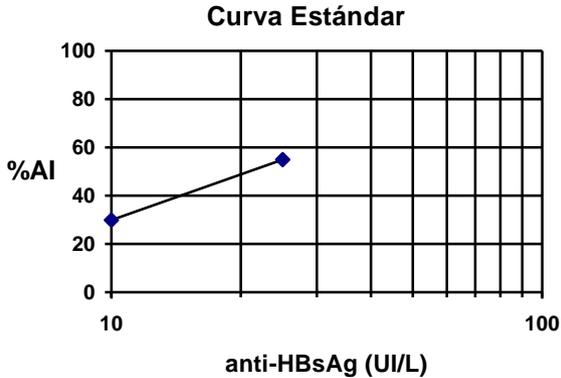
Los resultados de las muestras se calculan por interpolación del Porcentaje de Actividad Inhibitoria (%A.I) correspondiente, sobre la recta que ajusta el %AI de los Sueros Estándares versus el logaritmo de sus concentraciones. Por extrapolación de la recta se cuantifica hasta 10 UI/L (Ver gráfico).

$$\%A.I = 100 - (F/F_0 \times 100)$$

F: Fluorescencia promedio de los duplicados de los Sueros Estándares y las muestras.

F₀: Fluorescencia promedio de los duplicados del Control Negativo (si ambos valores se encuentran dentro del rango permitido).

En caso que uno de los valores del Control Negativo se encuentre fuera del rango permitido; para los cálculos se utiliza el otro valor que si cumple con el rango, aunque en los resultados de la validación de la placa se muestra el valor promedio de los valores.



CONTROL DE LA CALIDAD

I.- El programa de cálculo UMELISA ANTI-HBsAg incluye un control de calidad automático que rechaza el ensayo cuando:

- 1-Los valores de fluorescencia del Control Negativo están fuera del rango permitido (80 a 160 unidades).
- 2-La diferencia entre los duplicados de ambos Sueros Estándares es mayor al 20 % con respecto al valor medio correspondiente.
- 3-El % AI (calculada) para 10 UI/L es inferior al 20 %.

II.- Si la diferencia de los valores de fluorescencia de los duplicados de una muestra es mayor al 20 % con respecto al valor medio y al menos uno de ellos se encuentra dentro del rango de la Curva Estándar, se adiciona un asterisco (*) al resultado estimado de la concentración de la muestra como indicador de imprecisión. Rechaza los resultados de una muestra si uno de sus duplicados es menor que 10 UI/L y el otro mayor que 50 UI/L.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los niveles de anti-HBsAg protectores se encuentran por encima de 10 UI/L. Las muestras comprendidas entre 10 y 50 UI/L podrán ser cuantificadas, las que se encuentren por debajo de 10 UI/L serán interpretadas como muestras negativas y su resultado se expresa como <10 UI/L. Las que sean superiores a 50 UI/L deberán diluirse si se desea conocer su concentración.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

1. PRECISIÓN.

Se evaluaron tres muestras de concentraciones conocidas de anti-HBsAg en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante varios días (interensayo).

Precisión del UMELISA ANTI-HBsAg

UI/L	Intraensayo		Interensayo	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
14,0	1,22	8,41	1,44	10,30
29,4	1,80	8,12	2,03	6,91
46,4	2,01	4,41	2,27	4,90

DE: Desviación Estándar. CV: Coeficiente de Variación.

2. EXACTITUD.

La adición de diferentes cantidades de anti-HBsAg a un suero humano negativo promedió 101,66 ± 5 % de recuperación.

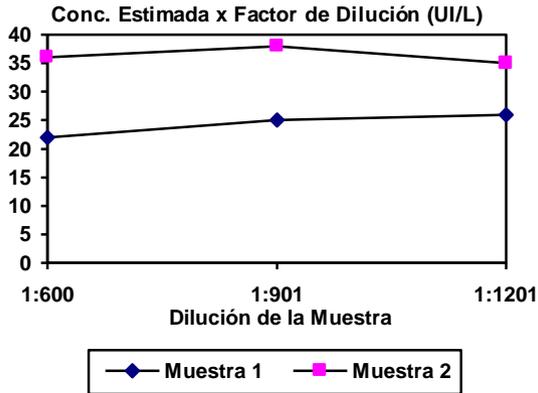
Recuperación del UMELISA ANTI-HBsAg

Muestras	anti-HBsAg esperado (UI/L)	anti-HBsAg observado (UI/L)	Recuperación (%)
1	15,81	16,53	104,55

Muestras	anti-HBsAg esperado (UI/L)	anti-HBsAg observado (UI/L)	Recuperación (%)
2	26,43	25,66	97,09
3	46,56	48,11	103,33

Se realizaron diluciones a muestras de pacientes con altos niveles de anti-HBsAg. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fue del $\pm 3\%$ de la concentración original.

Paralelismo del UMELISA ANTI-HBsAg



3. DETECTABILIDAD.

La detectabilidad del **UMELISA ANTI-HBsAg** es de 10 UI/L. Se definió como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente al Suero Estándar R3 - 3 D.E.

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Kane,M.: Control of Hepatitis B virus infection through universal infant immunization with Hepatitis B vaccine. Viral Hepatitis Management standards for the future. Abstracts and Posters. Cannes, 1992. p.22.
- 2-Alter,M.J.: Community-required viral Hepatitis (B and C) in the United States. Viral Hepatitis Management standards for the future. Abstracts and Posters. Cannes, 1992. p.23.
- 3-Alter, M. J., Hadler, S. C., Margolis, H. S. et al.: The changing epidemiology of Hepatitis B in the United States. Need for alternative vaccination strategies. JAMA 263:1218-1222, 1990.
- 4-Centers for Disease Control. Hepatitis B virus: A comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination: Practices Advisory Committee (ACIP). 40 (No RR-13) MMWR ,1991.
- 5-Missler, U. Wood, W. G.: A sensitive and rapid luminescence sandwich assay for antibody to Hepatitis B surface antigen (Anti HBsAg). Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, 1:11-12, 1990.

Marzo 12, 2004

UMELISA ANTI-HBsAg

Código UM 2023

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA.

Teléfono: 208-2929, Fax: (537) 208-6514.