

## Hepatitis B

### Antígeno de superficie (Elisa)

#### 1.0. USO PREVISTO

El antígeno de la hepatitis B de superficie (HBsAg) EIA kit es un kit de inmunoensayo enzimático en formato microstrip para la detección cualitativa de HBsAg en el suero humano o plasma.

Las muestras desconocidas no reactiva con el EIA Atlas HBsAg son negativas para el HBsAg. Las muestras con una reacción positiva deberán ser reexaminadas y confirmadas por una prueba de neutralización.

#### 2.0. INTRODUCCION

La hepatitis B es una enfermedad causada por una infección viral. La vía de infección puede ser la punción inadecuada, la transfusión de sangre o incluso mediante el consumo de agua o alimentos contaminados.

La hepatitis B se ha convertido en un problema significativo para la gestión de la salud pública. Casi uno de cada diez adultos, que han sido infectados por la hepatitis B (VHB), desarrolla algún tipo de enfermedad crónica del hígado y se convierte en un portador a largo plazo del VHB. La detección de la hepatitis B es una urgente necesidad. La hepatitis B es una enfermedad inmunológica, la invasión del cuerpo humano por virus de la HB induce reacciones autoinmunes, que dañan el hígado. Los componentes del virus (antígenos) y las respuestas del huésped (anticuerpos), los marcadores inmunológicos llamados a menudo han sido utilizados frecuentemente como herramientas de diagnóstico.

Hay seis marcadores inmunológicos de VHB: HBsAg, HBeAg, HBeAg y sus respectivos anticuerpos. El HBsAg sin embargo, es el primer marcador que aparece en el suero. La presencia de HBsAg indica infección reciente y si persiste por más de 6 meses el paciente puede llegar a ser un portador crónico.

#### 3.0. PRINCIPIO

Atlas HBsAg adopta el "principio de sandwich" como la base de la prueba cuando una muestra positiva es incubada dentro del pocillo, el anticuerpo monoclonal recubierto (anticuerpo en fase sólida) se une al HBsAg de la muestra. La incubación con un segundo anticuerpo monoclonal anti-HBsAg marcado con la enzima peroxidasa (anti-HBsAg-HRP) lleva al inmunocomplejo sandwich a ligarse al pocillo: anticuerpo en fase sólida: HBsAg; anticuerpos HRP. La actividad de la HRP es entonces revelada por la adición de cromógeno / sustrato, el cual se convierte en azul y luego se vuelve amarillo después de bloquear la reacción con ácido.

#### 4.0. MATERIALES SUMINISTRADOS

##### • Microplacas recubierta

Un microplacas con 96 pocillos, recubiertos con un anticuerpo monoclonal de ratón contra HBsAg (8 tiras removibles con 12 pocillos cada una). Conservar a 2-8 C.

##### • Enzima conjugado

Un vial (7,5 ml) conteniendo una solución de Anti-HBsAg-HRP. Conservar a 2-8 C

##### • HBsAg Control negativo

Un vial (0,8 ml) conteniendo suero humano negativo para el HBsAg. Conservar a 2-8 C.

##### • HBsAg control positivo

Un vial (0,8 ml) conteniendo suero humano positivo para el HBsAg. Conservar a 2-8 C

##### • Sustrato de solución

Un vial (7,5 ml) conteniendo peróxido de hidrógeno de urea. Conservar a 2-8 C

##### • Solución de cromógeno

Un vial (7,5 ml) conteniendo tetrametilbenzidina estabilizada (TMB) 3,3'-5,5. Conservar a 2-8 C.

##### • La Solución de Stop

Un vial (7,5 ml) conteniendo 1,0 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Listo para usar.

##### • Buffer de Lavado (20X conc.)

Un vial (30 ml) conteniendo un buffer fosfato salino.

#### Preparación de la solución de trabajo

Dentro del Becker graduado de al menos 800 ml de capacidad, verter el contenido completo de la solución de trabajo concentrada (30ml). Enjuagar el vial con agua destilada y verter también esta agua destilada dentro del Becker hasta el tope hasta un total de 600 ml. Transferir el contenido del Becker dentro de una botella de 100 ml para conservar.

#### 5.0. EQUIPOS Y MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUPLIDOS

- Micropipetas de precisión y tips (50 ul).
- Incubadora (+37 ° C).
- Lavador de placas automático.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.
- Paño adsorbente o papel.
- Agua destilada.
- Mezclador Vortex.

#### 6.0. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. El control positivo es elaborado de HBsAg es elaborado de suero HBsAg positivo y ha sido calentado a 60°C por 10 horas. Este es método es generalmente aceptado para inactivar el agente de la hepatitis. Sin embargo, por precaución de seguridad, estos deberán ser tratados como material potencialmente infeccioso. Ambos controles positivo y negativo han sido probados y han sido encontrados negativo para el virus HIV 1-2, y Hepatitis C. Sin embargo, estos deberán ser tratados como agentes potencialmente infecciosos.

6.2. No fumar o comer donde hay manejo de especímenes o reactivos del kit.

6.3. No pipetear con la boca. Use guantes de PVC cuando este manejando reactivos del kit o especímenes y lave bien sus manos.

6.4. Contenedores no ácidos deben limpiarse a fondo con una solución de hipoclorito de sodio al 5%.

6.5. Todos los materiales a desechar deben ser adecuadamente desinfectados antes de desecharse. Los desechos, tanto líquidos como sólidos deben ser autoclave por una hora a temperatura de 121°C. Los desechos sólidos pueden incluso ser incinerados. Los desechos no ácidos pueden ser tratados con hipoclorito de sodio (solución blanqueadora) diluida a una concentración final al 1.0%. Desechos líquidos ácidos requieren neutralización antes un tratamiento similar y deberán tomarse 30 minutos para obtener una efectiva desinfección.

#### 7.0. COLECCIÓN DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

En este kit de diagnóstico se puede utilizar suero o plasma. Las muestras de sangre entera deben ser separadas de células rojas de la sangre tan pronto como sea posible a fin de evitar la hemólisis. También se debe quitar los coágulos. Las muestras deben ser refrigeradas de 2 ° C a 8 ° C antes de la prueba para minimizar el deterioro. Para el almacenamiento a largo plazo deben ser congelados por debajo de 20 ° C.

#### 8.0. PROCEDIMIENTO

8.1. Llevar todos reactivos y muestras a temperatura ambiente (15 ° C-30 ° C) antes de comenzar el ensayo. Agitar suavemente antes de usarlo. Ajuste la incubadora a 37 ° C, si es necesario.

8.2. Anote los números relativos de las muestras y los pocillos en la hoja de datos. Un pocillo para el blanco, otros cinco pocillos para los controles y un pocillo por pocillo cada muestra. Si el experimento no necesita toda la placa, retire las tiras restantes de la titular de la tira y almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de ziplock (incluida en el kit) que contiene desecante.

8.3. Reserve un pocillo para el blanco, agregar 50 ul del control negativo para cada uno de cada uno de los tres pocillos, 50 ul del control positivo de cada uno de los dos pocillos y 50 ul de la muestra en los respectivos pocillos, y luego pipetee 50 ul de Anti-

HBsAg de la solución de trabajo del conjugado con peroxidasa en cada pocillo, excepto el blanco (1A), de acuerdo al siguiente esquema:

- 1A: En blanco
- 2A, 3A, 4A: suero control negativo
- 5A, 6A: suero control positivo
- 7A: Las muestras

**Nota: Use un tips individual para cada pipeta para evitar contaminaciones cruzadas.** Si más de 2 o 3 corridas por placa son necesarias y se utilizan aparatos fiables (i.e., pipetas, lavadoras, etc), se puede pipetear el control negativo en duplicado y el control positivo en singleton.

8.4. Se incubaba la placa en un incubador a 37 ° C durante 30 minutos.

8.5. Al final de la incubación, lavar las tiras 6 veces con la solución de lavado de trabajo, ya sea manualmente o con lavadora automática. Después del lavado final, asegúrese de que toda solución es perfectamente removida de cada pozo.

**Nota: Un proceso de lavado adecuado es esencial para la realización de los ensayos buena.**

8.6. Dispensar 50 ul de sustrato cromógeno A y B, incluyendo 1A. Mezcle horizontalmente e incube durante 10 minutos a 37 ° C (evitar la exposición a la luz directa del sol).

8.7. Detenga la reacción añadiendo 50 ul de reactivo de bloqueo a cada pocillo (incluido el blanco) en el mismo orden adoptado por la adición de la solución de cromógeno / sustrato.

8.8. Después de agregar la solución de stop, leer el color que aparece en el lector de microplacas a 450 nm. La lectura debe hacerse dentro de los 30 minutos del stop.

**Nota: El lector debe ser borrado a 450 nm contra el blanco. Se recomienda que esté disponible la medición de absorbancia bicromática con una longitud de onda de referencia de 620nm.**

#### 9.0. PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Las placas de microtitulación pueden ser lavadas manual o automáticamente, en cuyo caso es absolutamente necesario programar el lavador de microplacas de acuerdo a las siguientes direcciones:

Aspire la mezcla de incubación de los pocillos de la primera tira y dispense 350ul de solución de lavado. Poco después, procese otras tiras de la misma manera. Repita este procedimiento con 5 veces más, para un total de 6 ciclos, asegurándose de que la solución de lavado se queda en los pozos durante 30 segundos. (tiempo de remojo) en cada ciclo. Un procedimiento de lavado adecuado es esencial para una buena realización de los ensayos.

#### 10. PRUEBA DE VALIDEZ

Prueba es válida si:

1. La media del control negativo es menor que 1,10 O.D.
2. La media del control positivo es igual o superior a 0.6 O.D.

#### 11.0. DETERMINACION DEL VALOR DE CUT-OFF Y LA INTERPRETACION DE RESULTADOS

Valor de Cut-off = 2.1 \* NC (Media Control Negativo)

Si el valor de la DO del control negativo es inferior a 0,05, debe ser reportado como 0.05. Si es superior a 0,05, debe ser reportado como el valor real de OD medido.

Ejemplo: NCX = 0,032  
Cut-off = 2.1 \* 0.05 = 0.105

Cualquier muestra, en la que la absorbancia es igual o superior al valor de cut-off, se considera positiva para el HBsAg. Cualquier muestra, en la que la absorbancia es menor que el valor de Cut-off calculado, se considera negativa para el HBsAg.

#### 12.0. SENSIBILIDAD

Sensibilidad: 0.5ng/ml

### **13.0. ESPECIFICIDAD**

Especificidad:> 99,5

Ambos subtipos ad y ay se detectan.

### **14.0. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

14.1. El usuario de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión de las instrucciones. La estricta adhesión con el protocolo es necesario para obtener unos resultados fiables, en particular, la muestra y pipeteo de reactivos correctos, junto con lavados y tiempos de las etapas de incubación son esenciales para una detección precisa y reproducible de HBsAg.

14.2. Use las muestras de plasma frescas, o las muestras congeladas y descongele sólo una vez. Muestras de la degradación, así como la congelación – descongelación puede causar resultados erróneos. No utilice muestras inactivadas por calor.

### **15.0. REFERENCIAS**

1. Krugman, S. Overby, L.r. et al.  
N.Engl. J. Med., 300:101,1979
2. Mushahwar, I.K.,Dienstag, J.L. et al.  
Amer. J. Clin. Pathol, 76:773,1981
3. Magnus, L.O.,Lindholm, A., et al.  
J. Am. Med. Assoc., 231:356,1975

### **ATLAS MEDICAL**

Revision A (06.03.2008)