

HBsAg

Anticuerpos Contra el Virus de la Hepatitis Tipo B antígeno (Elisa)

Uso:

HBsAg ELISA se utiliza para la determinación cualitativa del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en suero o plasma humano. Esta prueba está indicada para la detección de sangre y productos sanguíneos que se utilizarán para transfusiones y como ayuda para el diagnóstico de infección por hepatitis B existente o previa.

Resumen:

La hepatitis B es una enfermedad infecciosa causada por el virus de la hepatitis B (VHB) que infecta el hígado de los homínidos, incluidos los humanos, y provoca una inflamación denominada hepatitis. El VHB se excreta en fluidos corporales como semen, saliva, sangre y orina en personas con infección aguda o crónica. El virus de la hepatitis B se conoce como un virus transmitido por la sangre porque se transmite de una persona a otra a través de sangre o fluidos contaminados con sangre.

La transmisión del virus de la hepatitis B resulta de la exposición a sangre o fluidos corporales infecciosos.

Cuando el VHB invade el cuerpo, causa daño hepático a través de la inducción de autoinmunidad. Se han encontrado tres inmunidades, antígeno de superficie (HBsAg)/HBsAb, antígeno central (HBcAg)/HBcAb y antígeno e (HBeAg)/HBeAb. Como es difícil detectar el antígeno central en el suero, los otros cinco se han hecho para diagnosticar el VHB. El antígeno de superficie contiene el determinante "a", común a todos los subtipos virales conocidos e inmunológicamente distinguidos en dos subgrupos distintos (ay y ad). El VHB tiene 10 serotipos principales y se han reconocido cuatro subtipos de HBsAg (adw, ady, ayw y ayr). El HBsAg se puede detectar de 2 a 4 semanas antes de que los niveles de ALT se vuelvan anormales y de 3 a 5 semanas antes de que se desarrollen los síntomas. La detección serológica de HBsAg es un método poderoso para el diagnóstico y la prevención de la infección por VHB y ELISA se ha convertido en un sistema analítico ampliamente utilizado para la detección de donantes de sangre y el diagnóstico clínico de VHB en individuos infectados.

Principio:

El EIA de HBsAg es un inmunoensayo sándwich simultáneo en fase sólida, que emplea anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales específicos para HBsAg. Los pocillos de microtitulación están recubiertos con anticuerpos monoclonales específicos para HBsAg. Se añade una muestra de suero a los pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpos junto con anticuerpos policlonales conjugados con enzimas. El HBsAg, si está presente, formará un complejo anticuerpo-HBsAg-anticuerpo-enzima. A continuación, se lava la placa para eliminar el material no unido. Finalmente, se añade una solución de sustrato a los pocillos y se incuban. Se desarrollará un color azul en proporción a la cantidad de HBsAg presente en la muestra. La reacción enzima-sustrato se puede detener y el resultado se visualiza a simple vista o se lee mediante un lector de placas EIA para determinar la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm (450 nm/630 nm) y es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos.
- Control Positivo, 1 vial, 0,5 mL.
- Control negativo, 1 vial, 0,5 mL.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 6 mL
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 20 mL (concentrado 20X).
- Sustrato A, 1 vial, 6 mL.
- Sustrato B, 1 vial, 6 mL.
- Solución de parada, 1 vial, 6 mL.
- Bolsa plástica, 1 unidad.
- Inserto: 1 copia.

- Tapa Placa: 2 piezas.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministren varias medidas con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua desmineralizada.

Precauciones y Advertencias:

Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de este producto resultó negativo para la presencia de anticuerpos contra el VIH-1/VIH-2, así como para el antígeno de superficie de la hepatitis B, utilizando un método comercial autorizado. No obstante, debido a que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad completa de la ausencia de agentes infecciosos, este producto debe manipularse con precaución.

- Evite el contacto de los reactivos con los ojos y la piel. Si eso ocurre, lávese bien con agua.
- Use guantes.
- No pipetear con la boca.
- No fume.
- Deseche todos los materiales usados en un contenedor adecuado para desechos biopeligrosos. Los restos de muestras, controles, reactivos aspirados y puntas de pipeta deben recogerse en un recipiente para este fin y esterilizarse en autoclave durante 1 hora a 121°C o trate con hipoclorito de sodio al 10 % (concentración final) durante 30 minutos antes de su eliminación. (Los restos que contengan ácido deben neutralizarse previamente a la adición de hipoclorito de sodio).
- Ajuste el lavado de la placa utilizada (fondo plano) para lavar correctamente.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- No utilice reactivos después de la fecha de caducidad.
- Se debe tener mucho cuidado para evitar la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de los reactivos.
- Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra y cada reactivo.
- Los jabones y/o oxidantes que queden en los recipientes utilizados para la solución sustrato-TMB pueden interferir en la reacción.

Almacenamiento y Estabilidad:

Los kits de prueba sin abrir deben almacenarse entre 2 y 8°C al recibirlos y la microplaca debe guardarse en una bolsa sellada para minimizar la exposición al aire húmedo. Use los reactivos lo antes posible después de desempacar el kit.

Recolección y Preparación de Muestras:

El suero debe prepararse a partir de una muestra de sangre total obtenida mediante técnicas médicas aceptables. En esta prueba se puede utilizar suero o plasma. Retire el suero o el plasma del coágulo o de las células sanguíneas lo antes posible para evitar la hemólisis. Las muestras con gran cantidad de partículas deben clarificarse mediante centrifugación antes de su uso. Se pueden utilizar muestras congeladas a -20°C o menos. Evite congelar y descongelar repetidamente.

Procedimiento de Prueba:

- Lleve el kit ELISA para anticuerpos contra el antígeno Core del virus de la hepatitis B (todos los reactivos) y las muestras a temperatura ambiente antes de usarlas (aproximadamente 30 minutos).
- Diluya la solución de lavado concentrado 1:20 con agua desmineralizada.
- Identifique los pocillos de la microplaca para los controles y la muestra del paciente que se analizará. Vuelva a colocar las tiras de micropocillos no utilizadas en la bolsa, selle y guárdela a 2-8 °C.
- Dispense 100 µl de control positivo y control negativo por duplicado en los pocillos respectivos. Coloque un pocillo en blanco como control de fondo y 100 µl de muestras de suero o plasma en los pocillos de prueba respectivos.

- Agregue una 50 µl de conjugado enzimático a cada pocillo. Mézclelo suavemente haciendo girar la placa de microtitulación en un banco plano durante 1 minuto. No agregue el conjugado enzimático al pocillo en blanco.
- Incube la placa a 37°C durante 30 minutos.
- Lave cada pocillo 5 veces llenándolos con solución de lavado diluido, luego invierta vigorosamente la placa para sacar toda el agua y bloquee el borde de los pocillos con papel absorbente durante unos segundos.
- Agregue 50 µl de solución de sustrato A (sustrato HRP) a cada pozo, luego agregue 50 µl de solución de sustrato B (TMB) a cada pozo. Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción de color.
- Calibre el lector de placas con el pozo en blanco y lea la absorbancia a 450 nm. Si se utiliza un instrumento de doble filtro, establezca la longitud de onda de referencia en 630 nm. Calcule el valor de corte y evalúe los resultados.

Interpretación de Resultados:

Una corrida es válida si:

- En cada ensayo debe incluirse el complemento completo de Blancos, Controles Positivo y Negativo.
- Los valores del Control Negativo deben tener una absorbancia ≤ 0.10 después de restar el Blanco.
- El valor del control positivo debe tener una absorbancia ≥ 1.00 después de restar el blanco.

Cálculo del valor de corte (COV):

Media de los Controles Negativos (NCx) * 2.1

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

Lectura de OD Positiva: \geq Valor de corte

Lectura de OD Negativa: $<$ valor de corte

Rendimiento de la Prueba y Resultados Esperados:

Especificidad Clínica:

La especificidad clínica de este ensayo fue determinada por un panel de muestras obtenidas de 2500 donantes de sangre sanos y 300 pacientes hospitalizados sin diagnosticar. Las muestras repetidamente reactivas y las muestras confirmadas como positivas con la prueba de referencia no se incluyeron en el cálculo de la especificidad.

	Muestra	-	+	Positivos Confirmados	Especificidad	Falsos Positivos
Donantes	2500	2447	56	53	99.87%	3
Pacientes	300	274	27	26	99.63%	1

Sensibilidad Clínica:

La sensibilidad clínica de HBSAG ELISA se calculó mediante un panel de muestras obtenidas de 670 pacientes con hepatitis B con un historial clínico bien caracterizado basado en ensayos de referencia para la detección de HBSAG, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe y anti-HBc. Se utilizó la prueba ELISA de HBsAg autorizada como ensayo de confirmación. Los resultados de la evaluación se dan a continuación. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

	Muestra	-	+	Positivos Confirmados	Especificidad	Falsos Negativos
Agudo	200	0	200	200	100.00%	0
Crónico	400	0	399	400	99.75%	1
Recuperación	70	65	5	5	100.00%	0

Especificidad Analítica:

- No se observó reactividad cruzada con muestras de pacientes infectados con HAV, HCV, HIV, CMV y TP.
- No se observó interferencia de factores reumatoides hasta 2000U/ml.
- Durante las pruebas clínicas, no se observó efecto gancho a dosis altas hasta concentraciones de HBsAg de 200 000 ng/ml.
- También se han analizado muestras congeladas para comprobar si hay interferencias debidas a la recogida y el almacenamiento.

Sensibilidad de Punto Final Analítico (Límite de Detección Inferior):

La sensibilidad del ensayo se calculó mediante los estándares de referencia proporcionados por el Laboratorio de referencia para productos de inmunología. El ensayo muestra una sensibilidad en el límite de 0,5 ng/ml (ad r) y 0,5 ng/ml (adw, ay)

Reproducibilidad:		Corrida a Corrida		Entre Corridas	
Tipo de Muestra	No	Media OD	CV%	Media OD	CV%
0.5ng/ml HBsAg	10	0.175	0.106	0.15	11.00%
Positivo Débil	10	0.457	0.09	0.432	9.50%
Positivo Moderado	10	1.572	0.07	1.437	7.50%
Positivo Fuerte	10	2.327	0.042	2.302	4.40%
Control Positivo	10	2.322	0.041	2.315	4.20%

Limitaciones:

- Con base en un solo resultado de prueba reactiva, una muestra no debe considerarse positiva para HBsAg. Se deben realizar más pruebas, incluidas las pruebas de confirmación, antes de que una muestra se considere positiva para HBsAg. Un resultado de prueba no reactivo no excluye la posibilidad de exposición al virus de la hepatitis B. Los niveles de HBsAg pueden pasar desapercibidos tanto en la infección temprana como tardía después de la infección. Las muestras que contienen precipitado pueden dar resultados de prueba inconsistentes.
- Al igual que los demás inmunoensayos sensibles, existe la posibilidad de que se produzca una reacción no repetible debido a un lavado inadecuado. Así que aspire el pozo o elimine todo el contenido de los pozos por completo antes de agregar la solución de lavado.
- El control positivo del kit de prueba no debe utilizarse para cuantificar la sensibilidad del ensayo. El control positivo se utiliza para verificar que los componentes del kit de prueba sean capaces de detectar una muestra reactiva, siempre que se siga el procedimiento definido en el kit y se cumplan estrictamente las condiciones de almacenamiento.

