



HBsAg CONFIRMATORY TEST
Para la confirmación de muestras positivas con el UMELISA
HBsAg PLUS.

INTERÉS CLÍNICO

Con el descubrimiento del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (1) se crearon métodos de elevada sensibilidad y especificidad para su identificación. A pesar de la alta especificidad de estas técnicas de pesquisaje, se pueden obtener resultados falsos positivos debido a errores de manipulación, instrumentales o a la ocurrencia de reacciones inespecíficas (2,3,4,5). Es por ello que surgen los ensayos confirmatorios, que nos permiten afirmar que la reacción positiva es provocada por la presencia de HBsAg en la muestra.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El ensayo HBsAg CONFIRMATORY TEST se basa en el principio de neutralización, mediante el cual una muestra repetidamente positiva reaccionará con un suero neutralizante (suero de conejo anti-HBsAg positivo) y como referencia con un suero control, libre de anti-HBsAg (suero de conejo normal). Los anticuerpos en exceso neutralizarán los determinantes antigénicos de la muestra, lo que será demostrado por una disminución significativa de la señal de fluorescencia con respecto a la muestra tratada con el reactivo control.

Para su realización, este ensayo necesita del juego de reactivos **UMELISA HBsAg PLUS.**

CONTENIDO DEL ESTUCHE
Código UM 2003-C (20 pruebas)

Contenido:

R1: Reactivo Control	1x 1 mL
R2: Reactivo Neutralizante	1x 1 mL
R3: Control Positivo*	1x 4,5 mL

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante y se suministran listos para usar.

* El R3 contiene 10 ± 1 UI/mL de HBsAg, inactivado por tratamiento termoquímico y calibrado frente a un estándar secundario de HBsAg, el cual ha sido preparado a partir del patrón internacional (IRP) 80/549 de la OMS. Es negativo a las pruebas de detección de anti-VIH 1+2, anti-VHC y Sífilis.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento si se mantienen de 2 a 8 °C.

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.

MATERIALES NECESARIOS

Los requeridos para el UMELISA HBsAg PLUS.

Material adicional:

- Tubos, tiras o placas.
- Solución de cloruro sódico al 0,9 %.

PRECAUCIONES

-Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos y muestras estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

-Añada los reactivos control y neutralizante con puntas independientes para evitar la contaminación entre ambos, lo cual puede provocar la interpretación errónea de los resultados e inutilizar el juego de reactivos.

- Manipule las muestras, el control positivo y los reactivos control y neutralizante como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Coloque los materiales utilizados en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilícelos en autoclave.

-Utilice puntas diferentes en cada pocillo al añadir las muestras.

-No intercambie reactivos de lotes diferentes.

-Todas las precauciones descritas en el UMELISA HBsAg PLUS son válidas en este caso.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1-Preparación del Control Positivo y las muestras.

El Control Positivo se presenta en el estuche listo para usar.

Las muestras se deben analizar sin diluir y diluidas 1:101 (10 µL de muestra + 1000 µL de solución de cloruro sódico al 0,9 %).

Mezcle cada muestra, sin diluir y diluida 1:101, en una proporción 5:1 con los Reactivos Control (R1) y Neutralizante (R2).

Volumen recomendado:

100 µL de muestra + 20 µL de R1.

100 µL de muestra + 20 µL de R2.

Incluya en cada ensayo el Control Positivo tratado como una muestra sin diluir.

2-Preincubación con los Reactivos Control y Neutralizante.

Incube durante 16 a 24 horas a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

La incubación se debe llevar a cabo en cámara húmeda en caso de no utilizarse recipientes herméticamente cerrados.

3-Realización de la técnica inmunoenzimática.

Utilice el juego de reactivos del UMELISA HBsAg PLUS.

La distribución de las muestras y controles se realizará de acuerdo al siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	M1c	M3c	M5c	M7c	M9c	M11c	M13c	M15c	M17c	M19c	M21c
B	PC	M1n	M3n	M5n	M7n	M9n	M11n	M13n	M15n	M17n	M19n	M21n
C	PC	M1c	M3c	M5c	M7c	M9c	M11c	M13c	M15c	M17c	M19c	M21c
D	PC	M1n	M3n	M5n	M7n	M9n	M11n	M13n	M15n	M17n	M19n	M21n
E	PN	M2c	M4c	M6c	M8c	M10c	M12c	M14c	M16c	M18c	M20c	M22c
F	PN	M2n	M4n	M6n	M8n	M10n	M12n	M14n	M16n	M18n	M20n	M22n
G	PN	M2c	M4c	M6c	M8c	M10c	M12c	M14c	M16c	M18c	M20c	M22c
H	PN	M2n	M4n	M6n	M8n	M10n	M12n	M14n	M16n	M18n	M20n	M22n

Donde:

PC: Control Positivo tratado con R1.

PN: Control Positivo tratado con R2.

Mc: Muestra tratada con R1.

Mn: Muestra tratada con R2.

Las posiciones marcadas corresponden a las muestras diluidas 1:101 y las no marcadas a las muestras sin diluir.

Se recomienda analizar las muestras, diluidas y sin diluir, por duplicado.

CONTROL DE LA CALIDAD

Se obtiene la óptima calidad del ensayo si se cumplen los criterios siguientes:

a) $PN/PC < 0,5$

Donde:

PN: Mediana de la fluorescencia del Control Positivo tratado con R2.

PC: Mediana de la fluorescencia del Control Positivo tratado con R1.

b) $PC \geq 75$ unidades de fluorescencia.

PN: De 1 a 15 unidades de fluorescencia.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Una muestra se considera **HBsAg POSITIVO** si diluida o sin diluir cumple con la siguiente condición:

$Mn \leq 0,7Mc$ y $Mc \geq 4$ unidades de fluorescencia.

- Una muestra se considera **HBsAg NEGATIVO** en todos los demás casos, excepto cuando la muestra diluida tratada con R1 presenta valores de fluorescencia mayores de 150 unidades, en tal caso el resultado no es válido y la muestra se debe **DILUIR**.

CARÁCTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

HBsAg CONFIRMATORY TEST	ORGANON POSITIVOS	ORGANON NEGATIVOS	TOTAL
POSITIVOS	244 (VP)	0 (FP)	244
NEGATIVOS	0 (FN)	29 (VN)	29
TOTAL	244	29	273

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100 = 100 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100 = 100 \%$$

Donde:

VP: Verdaderos Positivos

VN: Verdaderos Negativos

FP: Falsos Positivos

FN: Falsos Negativos

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Sherlock, S.: The natural history of Hepatitis B. Postgrad Med J. 63:7, 1987.
- 2-Sapin, R.: Interférence des anticorps dans les immunodosages avec marqueur. Ann Biol Clin. 48:361, 1990.
- 3-Kenna, J.G. et al.: Methods for reducing non-specific antibody binding in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. J Imm Methods. 85:409, 1985.
- 4-Boscato,L.M.,Stuart, M.: Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem. 34:27, 1989.
- 5-Maxei, M.K. et al.: Interference in Enzyme Immunoassays. J Clin Imm. 15:2, 1992.

Marzo, 2006

HBsAg CONFIRMATORY TEST.
Código UM 2003-C.
Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Ave. 25,
Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA.
Teléfono: 208-2929. Fax: (537) 208-5614.