


<p><i>República de Colombia</i></p>  <p><i>Gobernación de Santander</i></p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	1 de 19


*República de Colombia*



*Gobernación de Santander*

# MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSIÓN 3 MUREX POR LA TÉCNICA ELISA


Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	2 de 19

## TABLA DE CONTENIDO


1.	OBJETIVO .....	4
2.	ALCANCE .....	4
3.	NORMATIVIDAD APLICABLE .....	4
4.	RESPONSABILIDADES.....	4
5.	DEFINICIONES Y/O ABREVIATURAS.....	4
6.	CONDICIONES GENERALES .....	5
7.	FUNDAMENTO DEL METODO DE ELISA .....	7
7.1	ANTIGENO DE SUPERFICIE DE HEPATITIS B .....	7
7.2	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO.....	11
8.	LIMITACIONES O INTERFERENCIAS.....	12
9.	RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA.....	12
10.	CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA .....	13
11.	EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA	13
11.1	EQUIPOS.....	13
11.2	REACTIVOS .....	13
11.2.1	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	13
11.3	CONTROLES.....	14
11.4	MATERIALES DE REFERENCIA .....	14
12.	DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO .....	14
12.1	MONTAJE EQUIPO DE DSX.....	15

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	3 de 19

12.2 MONTAJE MANUAL .....	16
13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO.....	16
14. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	17
14.1 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS .....	17
14.3 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	18
15. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS.....	18
16. EXAMENES COMPLEMENTARIOS .....	18
17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA .....	19
18. CONTROL DE CAMBIOS .....	19
19. ANEXOS .....	19

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	4 de 19

## 1. OBJETIVO

Establecer los lineamientos generales para la detección de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en suero o plasma humano mediante la utilización de la técnica de ELISA para su detección.

## 2. ALCANCE

Este documento se tomará como referencia única para el procesamiento de muestras de suero que lleguen al laboratorio para la detección de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B que se procesan por ELISA.

## 3. NORMATIVIDAD APLICABLE

- NTC ISO/IEC 17025:2017

## 4. RESPONSABILIDADES

**Coordinador Del Laboratorio Departamental De Salud Pública:** se encargará de revisar y aprobar el actual documento, teniendo en cuenta que se cumplan con las normas establecidas, y de esta manera avalar los resultados emitidos por el laboratorio.

**Profesional Responsable De La Sección De Virología Del Laboratorio Departamental De Salud Pública:** se encargará de aplicar los lineamientos descritos en el documento con estándares de calidad, oportunidad y avalará los resultados que se procesen mediante este ensayo.


Será responsabilidad del profesional del Laboratorio de Inmunoserología aplicar lo descrito con calidad y oportunidad, así como, garantizar los resultados que se generan del mismo.

El personal del área deberá dar cumplimiento a lo consignado en el MANUAL DE ROLES Y RESPONSABILIDADES DEL PERSONAL DEL LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA MI-GS-MA-30

## 5. DEFINICIONES Y/O ABREVIATURAS

**Anticuerpo:** Los anticuerpos so moléculas que producen los linfocitos B como respuesta a un antígeno.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	5 de 19

**Antígeno:** Sustancia o molécula que haga que el cuerpo produzca una respuesta inmunitaria contra ella

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color.

## 6. CONDICIONES GENERALES

Los equipos utilizados en el procesamiento de muestras para diagnóstico de Hepatitis B requieren de las siguientes condiciones ambientales:

### DSX

Temperatura: 15°C a 30°C

Humedad relativa: 15% a 85%

### LAVADOR AUTOMATIZADO

Temperatura: 10°C a 40°C

Humedad relativa: 10% a 80%

### LECTOR DE ELISA

Temperatura: 10°C a 40°C

Humedad relativa: 10% a 80%


El Laboratorio realiza monitoreo de Temperatura y Humedad Relativa y se registran en el formato CONTROL TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA MI-GS-RG-37. Durante el montaje de la prueba MUREX HBsAg VERSION 3 se requiere que la temperatura del área de procesamiento se encuentre entre 18°C y 30°C:

El personal encargado del proceso debe estar entrenado en las técnicas de diagnóstico virológico, conocer los factores de riesgos biológicos y las condiciones de bioseguridad tipo 2 en el manejo, conservación y descarte de material biológico.

Aplicar normas de Bioseguridad durante el procesamiento de muestras y utilizar los elementos de protección personal que incluye: bata, guantes, caretas y protección ocular.

Las muestras deben manejarse con las debidas precauciones como material potencialmente infectocontagioso.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	6 de 19

Dado que ni la inactivación ni el método de test pueden excluir con total seguridad el riesgo de infección, se recomienda tratar este tipo de material con el mismo cuidado que una muestra de paciente.


### ***Precauciones y recomendaciones de bioseguridad para el profesional***

- Lea siempre las instrucciones del inserto antes de abrir un estuche nuevo.
- Evite la contaminación microbiana, trabajando con todos los cuidados exigidos bajo las condiciones de bioseguridad tipo 2.
- Ningún reactivo o elemento que este derramado, dañado, averiado y vencido deberá ser utilizado.
- Si ocurre cualquier contacto con la piel, lave con abundante agua.

### ***Precauciones en el análisis:***

- No utilice los reactivos transcurrida la fecha de caducidad. Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que puede afectar a su rendimiento y producir resultados erróneos.
- No modifique el Procedimiento del ensayo ni utilice reactivos de otros fabricantes ni de otros lotes, a menos que se indique que el reactivo pueda utilizarse indistintamente. No reduzca el tiempo de incubación recomendado.
- Antes del uso, deje que los reactivos y las muestras alcancen una temperatura entre 18°C y 30°C. Después del uso, vuelva a almacenarlos bajo las condiciones antes indicadas.
- Lave, con ácido clorhídrico (2 mol/L), todos los materiales de vidrio que vaya a utilizar con los reactivos y, a continuación, enjuáguelos con agua destilada o desionizada de primera calidad.
- Para almacenar los reactivos y las muestras no utilice refrigeradores que se descongelen automáticamente.
- No exponga los reactivos a la luz intensa ni a vapores de hipoclorito durante el almacenamiento o la incubación.
- Evite que los pocillos se sequen durante el ensayo. No cause contaminación cruzada en los reactivos.
- Utilice siempre la misma pipeta para la solución de sustrato de los ensayos. Asimismo, deberá utilizar siempre la misma pipeta para el conjugado.
- No toque ni salpique el borde de los pocillos con el conjugado. No pipetee expulsando aire hacia afuera. Se recomienda, siempre que sea posible, el pipeteo con la técnica inversa.
- Asegúrese de que el fondo de la placa esté limpio y seco y de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de la lectura de la placa.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	7 de 19

- Evite contaminar los micro pocillos con el talco de los guantes desechables. Si utiliza procesadores de micro placas automáticos:
  - No es necesario tapar las placas ni secarlas golpeándolas.
  - No permita que los líquidos del sistema contaminen las muestras o los reactivos.
  - Se debe excluir la posibilidad de contaminación cruzada entre ensayos cuando valide ensayos en procesadores completamente automáticos.

## 7. FUNDAMENTO DEL METODO DE ELISA

### 7.1 ANTIGENO DE SUPERFICIE DE HEPATITIS B

El antígeno de superficie (HBsAg) es el marcador de laboratorio más importante en el diagnóstico de la hepatitis B, tanto aguda como crónica; es un marcador indirecto de infección y en combinación con otros marcadores permite determinar si el paciente cursa con una infección aguda, crónica, resuelta o ha sido satisfactoriamente vacunado o tratado.


El HBsAg es el primer marcador serológico que aparece después de la infección y su persistencia por más de 6 meses indica una hepatitis B crónica.

La presencia de antígeno "e" (HBeAg) indica replicación activa del virus. Su ausencia no descarta la presencia del virus ya que pueden encontrarse formas de hepatitis B crónica HBeAg-negativo (mutantes del core-precore). Los pacientes que son seropositivos para antígeno "e", generalmente tienen replicación viral activa con riesgo elevado de enfermedad hepática. Se ha postulado que una de las funciones del antígeno "e" es inducir inmunotolerancia, particularmente en útero, ya que el antígeno puede atravesar la placenta.

La seroconversión del antígeno "e" ha sido considerada como el punto principal en la evaluación de la respuesta al tratamiento de pacientes antígeno "e" positivos y ha mostrado asociación con un menor riesgo de progresión de la enfermedad, aunque no protege el desarrollo posterior de hepatocarcinoma.

El diagnóstico se realiza por la detección de antígenos de superficie del virus de la hepatitis B en suero o plasma.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	8 de 19

## Anticuerpos virales

Algunas personas pueden aparecer positivas para el anticuerpo contra el core como hallazgo aislado y puede ocurrir en una variedad de casos.

1. Indicador de infección crónica por el virus B: en estas personas, el antígeno de superficie ha disminuido a valores indetectables, pero el DNA persiste detectable. Esta situación no es rara en personas de áreas de alta prevalencia de infección por virus B, pacientes con virus de inmunodeficiencia humana o infección por virus C.
2. Marcador de inmunidad posterior a la recuperación de una infección previa.
3. Falso positivo en personas de baja prevalencia sin factores de riesgo para el virus B. Estos individuos responden a la vacuna de forma similar a personas sin marcadores serológicos para el virus B.

Durante la infección, los antígenos virales están expuestos al sistema inmune, el cual responde produciendo su respectivo anticuerpo (anti HBs, anti-HBc y antiHBe).

El anticuerpo contra HBsAg (anti HBs) indica que el paciente se ha recuperado de la infección o inmunidad al virus; también es detectable después de la inmunidad que entrega la vacunación.

La presencia de anticuerpo contra el antígeno e (anti HBe) indica seroconversión de antígeno "e" positivo a negativo. Esta seroconversión (pérdida del antígeno "e" para la detección del anticuerpo) es el punto principal en el tratamiento para el grupo de pacientes HBeAg-positivos y se ha visto asociado a menor riesgo de progresión de la enfermedad.


## Infección aguda

La mayoría de los adultos infectados con el virus tienen un curso asintomático y únicamente el 20 al 35% tienen síntomas como fiebre, fatiga, anorexia y náuseas, antes de la aparición de ictericia. Más del 95% de los pacientes tienen enfermedad autolimitada que los lleva a una inmunidad durante toda su vida. Un pequeño subgrupo puede desarrollar hepatitis fulminante asociada a una alta mortalidad.

El antígeno de superficie aparece temprano y se detecta 6 a 10 semanas después de la exposición y está presente antes de la aparición de los síntomas. El antígeno "e" aparece posterior al antígeno superficie y es útil como marcador de replicación. Cuando los antígenos aparecen en sangre, las aminotransferasas usualmente se elevan.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma



 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	9 de 19

El período de incubación y el desarrollo de síntomas dependen de algunos factores como son la edad, modo de transmisión, tamaño de inóculo y se establece que es de 2 a 4 meses.

El primer anticuerpo que se eleva es dirigido contra el antígeno core y se denomina anticore IgM; este, en combinación con el antígeno en superficie son el mejor indicador de infección aguda.

En la fase sintomática el anticuerpo IgM tiene un pico y declina entre 3 y 12 meses después de la exposición. Esta disminución del anticore IgM se complementa con la producción y el aumento progresivo del anticore IgG, que puede permanecer detectable durante toda la vida.

El anticuerpo contra el antígeno V (antiHB e) está asociado con un rápido aclaramiento del antígeno "e", y la seroconversión coincide con un dramático aumento de aminotransferasas probablemente porque los anticuerpos causan una lisis de células infectadas.

### **Infección crónica**

Los individuos infectados con hepatitis aguda que persisten por más de 6 meses con niveles de antígeno superficie o aquellos que mantiene positivos para antígeno "e" después de que los síntomas se resuelven pueden desarrollar infección crónica, y usualmente son asintomáticos. En los estados tempranos de infección crónica, la replicación puede identificarse por la presencia de antígeno de superficie, antígeno "e" y el DNA del virus. El anticuerpo que encontramos será el anticore IgG.

El curso clínico de la infección puede ser variable con una actividad fluctuante de la enfermedad y una proporción de pacientes puede presentar formas rápidamente progresivas.

Pacientes con infección muy larga pueden tener una fase replicativa baja, caracterizada por la seroconversión del antígeno "e" al anticuerpo anti HBe. Esta seroconversión ocurre entre el 5 al 20% por año y en la mayoría de los casos la pérdida del antígeno "e" se asocia a una mejoría y normalización de aminotransferasas. (figura 1).

Los pacientes que fallan en depurar el virus y continúan con hepatitis activa tienen un riesgo elevado de cirrosis y carcinoma hepatocelular

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma


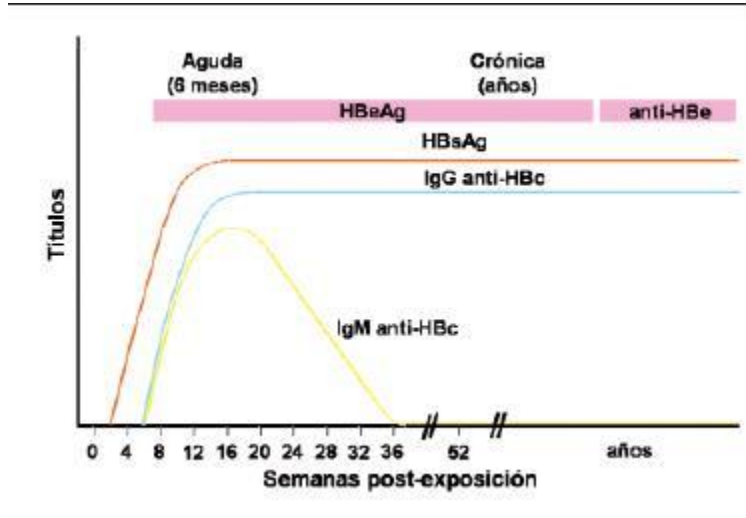
	<b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b>  <b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	10 de 19

Figura 1. Serología de hepatitis B crónica.



Se relaciona a continuación el algoritmo diagnóstico según Guía para la vigilancia por laboratorio de hepatitis virales del Instituto nacional de salud.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma


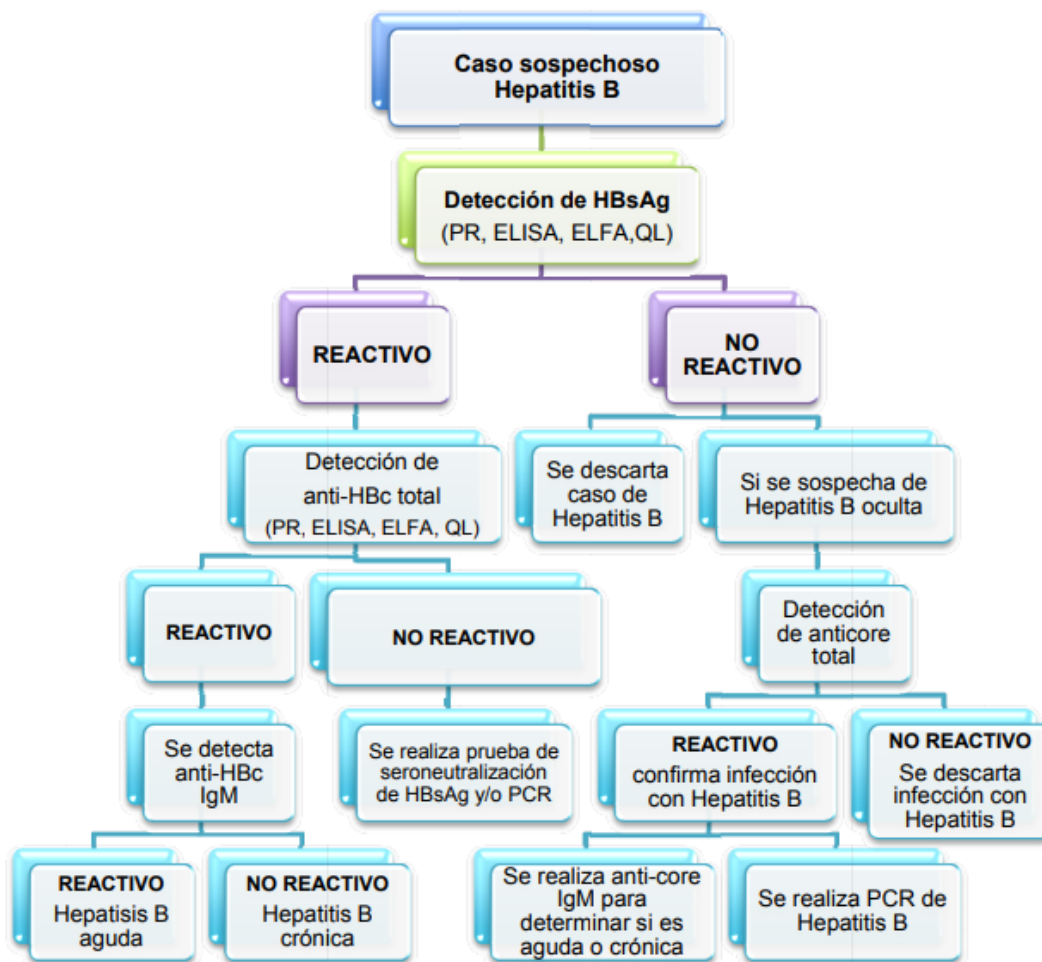
	<b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b>  <b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	11 de 19

Figura 2. Flujoograma Diagnóstico de Hepatitis B.




Fuente. Adaptado de: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia50.pdf>

## 7.2 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO

En el ensayo Murex HBsAg Versión 3, la muestra se preincuba en los micropocillos recubiertos con una mezcla de anticuerpos (monoclonales, de ratón) específicos para diferentes epítomos del determinante “a” del HBsAg. Los anticuerpos (de cabra) purificados por afinidad frente al HBsAg y conjugados con peroxidasa de rábano se añaden a la muestra en el pocillo. Durante los 2 pasos de incubación, el HBsAg presente en la muestra se une al pocillo, formándose un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima. Si el HBsAg no está presente, el

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	12 de 19

conjugado no se une. Después del lavado para eliminar la muestra y el conjugado no unido, se añade en los pocillos una solución que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. En los pocillos que contienen HBsAg y por lo tanto conjugado unido, se desarrolla un color violeta que se torna naranja cuando la reacción enzimática se suspende y al añadir ácido sulfúrico.

## 8. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS.

- Se deben seguir exactamente las instrucciones indicadas en los apartados Procedimiento del ensayo e Interpretación de los resultados de estas instrucciones de uso.
- Este ensayo sólo se ha evaluado para su uso con muestras suero y plasma con EDTA o Citrato.
- Un resultado negativo con un ensayo para la detección de antígenos no excluye la posibilidad de infección.
- Se pueden obtener resultados reactivos no repetibles con cualquier enzimoanálisis.
- Las muestras diluidas o coaguladas pueden dar resultados erróneos.
- Este ensayo no se ha validado para su uso con muestras de cadáveres.


### Las causas más habituales de errores son:

- La muestra, el conjugado o el sustrato no se han añadido en los pocillos de manera adecuada.
- El sustrato se ha contaminado con el conjugado.
- Contaminación con conjugados de otros ensayos.
- Las sondas del sistema de lavado están total o parcialmente obstruidas.
- El líquido de lavado no se ha aspirado totalmente y queda líquido en los pocillos.
- El fondo de los pocillos no está limpio y seco y hay burbujas en la superficie del líquido antes de la lectura de las placas.
- Fallo en la lectura a la longitud de onda adecuada (450 nm) o no se ha utilizado la longitud de onda de referencia incorrecta.

## 9. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Con este ensayo se pueden utilizar muestras de suero y plasma recogido con EDTA o Citrato. Asegúrese de que las muestras de suero estén totalmente coaguladas. Se deben eliminar las partículas en suspensión mediante centrifugación. Si las muestras se van a preparar con anticoagulantes líquidos se debe tener en cuenta el efecto de la dilución.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	13 de 19

Las muestras serán identificadas con un código consecutivo asignado en la recepción de muestras clínicas y quedarán registradas en la base de datos del evento HEPATITIS. Procedimiento TRAZABILIDAD DE MUESTRAS RECEPCIONADAS PARA DIAGNÓSTICO, VIGILANCIA Y/O CONTROL DE CALIDAD MI-GS-PR-100

## 10. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras son estables entre 2°C a 8°C hasta 72 horas, transcurrido el tiempo se pueden almacenar a -15°C.

## 11. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

### 11.1 EQUIPOS

- Equipo DSX para ELISA automatizado
- Lavador automático Thermo científico
- Lector de absorbancia Thermo científico
- Incubadora a 37+/- 1oC.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10UI
- Pipetas de precisión entre 100 y 500 uL.
- Probetas graduadas entre 250 y 500 ML.


### 11.2 REACTIVOS

- Diluyente de muestra: Listo para usar
- Micropocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales frente al HBsAg (96 pozos): Listo para usar
- Solución concentrada de lavado: Preparar solución de trabajo
- Conjugado: Listo para usar
- Concentrado de sustrato: Preparar reactivo de trabajo
- Diluyente de sustrato: Para preparar reactivo de trabajo "Sustrato"
- Solución de parada de reacción (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): No suministrada en el kit

#### 11.2.1 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Solución concentrada de lavado: Diluir 1:19 partes con agua destilada (Ejemplo: preparar 1 litro, diluya 50 ml de solución de lavado en 950 ml de agua destilada). Almacenar a temperatura entre 18°C y 30°C hasta por 30 días.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	14 de 19

- Solución de sustrato: Para preparar la solución de sustrato, añada una parte de diluyente de sustrato incoloro a la misma cantidad de concentrado de sustrato rosa en una cubeta de vidrio o de plástico limpia. Es importante que siga este orden para realizar la mezcla y que las pipetas y los materiales de vidrio que utilice para preparar la solución de sustrato estén limpios. La solución de sustrato también se puede preparar vertiendo todo el contenido del frasco del diluyente de sustrato en el frasco del concentrado de sustrato. Un frasco de solución de sustrato es suficiente para el análisis de al menos 5 placas. Estable entre 2°C y 8°C hasta un máximo de 2 días. Ver tabla N.1

**Tabla N.1** Volumen necesario de concentrado de sustrato y de diluyente de sustrato por número de pocillos y placas.

NÚMERO DE POCILLOS											NÚMERO DE PLACAS			
8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	96	1	2	3	4
<b>CONCENTRADO DE SUSTRATO (ml)</b>														
0,5	1	2	2,5	2,5	3	3,5	4	4,5	4,5	6	6	12	18	22
<b>DILUYENTE DE SUSTRATO (ml)</b>														
0,5	1	2	2,5	2,5	3	3,5	4	4,5	4,5	6	6	12	18	22

### 11.3 CONTROLES

Se utilizarán los controles incluidos en cada kit.

- Control negativo
- Control positivo

### 11.4 MATERIALES DE REFERENCIA

Los controles utilizados se encuentran incluidos dentro de cada kit de reactivos de acuerdo al analito a procesar.


Después de usar, volver a guardar los controles de 2°C a 8 °C o desecharlos en recipiente de paredes rígidas y depositar este en bolsa roja, al momento de terminado el kit.

## 12. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO

### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis llevar los reactivos y muestras a temperatura ambiente (18°C a 30°C)

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma


 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	15 de 19

1. Verificar en la BASE DE DATOS DE HEPATITIS las muestras a procesar
2. Diligenciar el formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644
3. Prepare la solución de sustrato y el líquido de lavado.

## 12.1 MONTAJE EQUIPO DE DSX

1. Realizar el encendido y mantenimiento del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.
2. Realice el ingreso de las muestras y la selección de la prueba MUREX HBsAg VERSION 3 siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.
3. De inicio al procesamiento de las muestras siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.
4. A continuación, el equipo inicia el procesamiento de las muestras realizando los siguientes pasos:
  - El equipo agrega 25 ul de Diluyente de muestra dentro de cada pozo
  - El equipo agrega 75 ul de muestra o control en cada pozo (según número de muestras programadas)
  - El equipo lleva la placa a incubación durante 60 minutos a temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
  - El equipo agrega 50 ul de Reactivo conjugado a cada pozo.
  - El equipo lleva la placa a incubación durante 30 minutos a temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
  - El equipo realiza el lavado: agrega 500 ul de solución de lavado. (Se realiza el procedimiento de lavado 5 veces).
  - El equipo agrega 100 ul de Solución sustrato a cada pozo
  - El equipo lleva la placa a incubación durante 30 minutos a temperatura  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
  - El equipo agrega 50 ul de Solución de parada a cada pozo.
5. El equipo lleva la microplaca a la estación de lectura y realiza la lectura a una longitud de onda de 450nm (longitud de onda de referencia entre 620 nm y 690 nm) y emite el resultado de las absorbancias.
6. Registrar los resultados en el Formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644
7. Realizar el mantenimiento y apagado del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL EQUIPO DSX MI-GS-IN-18.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	16 de 19

## 12.2 MONTAJE MANUAL

1. Agregue 25 ul de Diluyente de muestra dentro de cada pozo
2. Agregue 75 ul de muestra o control en cada pozo
3. Cubra con una cubierta de microplaca y dejar rotando durante 60 minutos a durante 60 minutos a temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
4. Agregue 100 ul de Reactivo conjugado a cada pozo.
5. Agite la placa manualmente golpeando suavemente los bordes durante 10 segundos.
6. Cubra con una cubierta de microplaca y dejar rotando durante 30 minutos a durante 60 minutos a temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
7. Realice el lavado: agrega 500 ul de solución de lavado. (Se realiza el procedimiento de lavado 5 veces). Una vez terminado el lavado invierta la placa y elimine el líquido de lavado restante golpeando la placa sobre papel absorbente.
8. Agregue 100 ul de Solución sustrato a cada pozo
9. Cubra con una cubierta de microplaca y dejar rotando durante 30 minutos a durante 30 minutos a temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
10. Agregue 50 ul de Solución de parada a cada pozo.
11. Realizar el encendido y mantenimiento del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL LECTOR DE PLACAS DE ELISA MI-GS-IN-27
12. Leer la absorbancia a 450 nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-690nm) siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL LECTOR DE PLACAS DE ELISA MI-GS-IN-27
13. Registrar la absorbancia obtenida a partir de la impresión del lector de microplaca en el formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644.
14. Registre los resultados de las concentraciones en el formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-644
15. Realizar el mantenimiento y apagado del equipo siguiendo las indicaciones del INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL LECTOR DE PLACAS DE ELISA MI-GS-IN-27.


## 13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO

Los resultados de un ensayo se valida en el formato CARTA CONTROL INMUNOSEROLOGIA MI-GS-RG-642 y serán válidos si los controles cumplen los siguientes criterios:

- Controles Negativos: La absorbancia media es inferior a 0.15

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma



 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b>  <b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	17 de 19

- Controles positivos: La absorbancia de cada control positivo es superior a 0.8 por encima de la absorbancia media del control negativo.
- En el Formato CARTA CONTROL INMUNOSEROLOGIA MI-GS-RG-642 se realizará el seguimiento a los controles de cada kit y la validación de la prueba según indicaciones para cada evento.
- Los ensayos que no cumplan estos criterios se deben repetir.
- Si los resultados obtenidos incumplen repetidamente los criterios de control de calidad o el funcionamiento correcto del ensayo, póngase en contacto con el Centro de Asistencia Técnica local.
- Calibración periódica de equipos se incluyen los equipos de virología en el PLAN METROLÓGICO DE EQUIPOS E INSTRUMENTOS MI-GS-RG-160 del Laboratorio Departamental anualmente e intervenciones intermedias de ser necesario, evidenciado en las HOJAS DE VIDA DE EQUIPOS MI-GS-RG-428.

## 14. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 14.1 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Cuando se calculen y se interpreten los resultados del ensayo, se debe interpretar cada placa por separado.

#### Control negativo

Calcule la absorbancia media de los replicados del control negativo

#### Ejemplo:

Pocillo 1: 0.084

Pocillo 2: 0.086

Total: 0.170

Media del control negativo:  $0.170/2=0.085$

Si la absorbancia de uno de los pocillos del control negativo es superior a 0.03 por encima de la media de los 2 pocillos, elimine este valor y calcule nueva media del control negativo a partir de los 2 replicados restantes.

#### Valor del punto de corte

Calcule el valor del punto de corte sumando 0.05 a la media de los replicados del control negativo.


#### Ejemplo:

Pocillo 1: 0.071

Pocillo 2: 0.075

Media del control negativo=  $(0.171+0.075)/2=0.073$

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b></p> <p><b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	18 de 19

Valor del punto de corte=  $0,073 + 0.05 = 0.123$

#### A. Lectura en el equipo DSX

Cuando el procesamiento y lectura del montaje se realice en el equipo DSX, este realiza los cálculos del punto de corte y emite el reporte con la absorbancia y la interpretación del resultado.

#### B. Lectura en el equipo lector de ELISA

1. Registrar las absorbancias en el Formato HOJA DE TRABAJO INMUNOSEROLOGIA PRUEBA ELISA MI-GS-RG-64
2. Registrar los resultados de los controles de calidad en el formato de CARTA CONTROL INMUNOSEROLOGIA MI-GS-RG-642, el cual calcula el Punto de corte.

### 14.3 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

#### Resultados no reactivos

Las muestras cuyos valores de absorbancia sean inferiores al valor del punto de corte se consideran No reactivas.

#### Resultados reactivos

Las muestras cuyos valores de absorbancia sean iguales o superiores al valor del punto de corte se consideran inicialmente reactivas.

### 15. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS


Los resultados de las absorbancias, índices o concentraciones obtenidos de cada técnica y registrados en las hojas de trabajos se registrarán en la BASE DE DATOS DE HEPATITIS al igual que la fecha, hora y responsable del montaje de la prueba.

Los resultados de estas pruebas serán emitidos en el formato INFORME CONSOLIDADO CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO INMUNOSEROLOGIA MI-GS-RG-585 y deberán interpretarse de acuerdo al INSTRUCTIVO EVALUACION DEL DESEMPEÑO VIROLOGIA Y BANCOS DE SANGRE MI-GS-IN-15.

### 16. EXAMENES COMPLEMENTARIOS

Las pruebas confirmatorias incluyen anti-HBc IgM.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<b>MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE HBsAg VERSION 3 MUREX POR LA TÉCNICA DE ELISA</b>  <b>LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-111
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	14/08/2024
		PÁGINA	19 de 19

## 17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- Inserto DiaSorin MUREX HbsAg VERSION 3. Primera edición. Fecha: 04/2009
- Blumberg, B.S. The Discovery of Australian Antigen and its Relation to Viral Hepatitis. Vitro. 1971;7:223
- Krugman, S. Glies J.P. Viral Hepatitis, Type B (MS-2-Strain). Further Observations on Natural History and Prevention. New England Journal of Medicine. 288, 755. 3
- Krugman, S. Overby L.R, et al. Viral Hepatitis Type B Studies On Natural History and Prevention Reexamined. New England Journal of Medicine. 300, 101.

## 18. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	14/08/2024	Emisión inicial del documento	<b>ALBA ROCIO ORDUZ A</b> Coordinador Grupo LSP  <b>ZULEMA GALVIS</b> Directora de Salud Integral  <b>SAMUEL SANTAMARÍA</b> Director de Planeación Y Mejoramiento en salud.	<b>EDWIN ANTONIO PRADA RAMIREZ</b> Secretario de Salud

## 19. ANEXOS

- INSTRUCTIVO DE MANEJO DE EQUIPO DSX MI-GS-IN-18
- INSTRUCTIVO DE MANEJO EQUIPO LECTOR DE ELISAS
- INSTRUCTIVO DE MANEJO EQUIPO LAVADOR DE ELISAS

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Mayté Gicela González	-	Jenny Osma