

*Rev Biomed 2003; 14:17-21.*

## ***Detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro empleando el UMELISA HBsAg PLUS.***

**Artículo Original**

Aurora Delahanty-Fernández, Irina Valdivia-Alvarez, Julio Ventura-Paz, Janette Trujillo-Brito, Darién Ortega-León, Ariel Palenzuela-Díaz.

Laboratorio de Hepatitis, Centro de Inmunoensayo, Habana, Cuba.

### **RESUMEN.**

**Introducción.-** Los enzimoimmunoensayo han sido empleados en la detección de HBsAg empleando muestras de sangre seca sobre papel de filtro debido a las ventajas de este tipo de muestras ya que disminuye la utilización de materiales de laboratorios, este tipo de muestras pueden ser utilizadas en aquellos países donde los recursos son limitados para realizar estudios epidemiológicos.

**Material y métodos.-** En este trabajo establecimos las condiciones óptimas para la elución de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro con el fin de realizar la detección de HBsAg empleando el UMELISA HBsAg PLUS. Se evaluaron 1053 muestras de suero y sangre seca sobre papel de filtro procedentes de donantes de sangre de la Ciudad de la Habana, Cuba.

**Resultados.-** En las muestras de suero se encontraron 9 individuos reactivos, de ellos 8 fueron confirmados como positivos por el ensayo confirmatorio HBsAg CONFIRMATORY TEST para un 0,75% de

positividad y en las de sangre seca sobre papel de filtro 6 de las confirmadas fueron reactivos lo que representa un 0,57% de positividad.

**Conclusión.-** Los resultados para ambos tipos de muestras fueron comparados y el índice Kappa fue de 0,85%, para una buena concordancia.

*(Rev Biomed 2003; 14:17-21)*

**Palabras clave:** Virus de la hepatitis B, HBsAg, papel de filtro, UMELISA.

### **SUMMARY.**

**Detection of HBsAg in eluates of blood spotted on filter paper using the UMELISA HBsAg PLUS.**

**Introduction.-** The enzyme immunoassays have been employed in the detection of HBsAg using samples of dry blood on filter paper due to the advantages of this type of samples, since it diminishes the use of materials of laboratories, this type of samples can be used in

*Solicitud de sobretiros: Aurora Delahanty-Fernández, Laboratorio de Hepatitis. División de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo, Calle134 y Avenida 25.Cubanacán. Playa. Ciudad de la Habana, Cuba. Teléfono 208 2928/30 Email: iqhbsag@cie.sld.cu  
Recibido el 2/Mayo/2002. Aceptado para publicación el 12/Septiembre/2002.*

Este artículo está disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb031415.pdf>

**Vol. 14/No. 1/Enero-Marzo, 2003**

those countries where the resources are limited to carry out epidemic studies.

**Material and methods.-** In this work we established the good conditions for the elution of the samples of dry blood on filter paper with the purpose of carrying out the detection of HBsAg using the UMELISA HBsAg PLUS. 1053 samples of serum, and dry blood were evaluated on filter paper, coming from blood donors of Havana City, Cuba.

**Results.-** In the samples of serum, 9 individuals were found reagent and 8 out of the 9 were confirmed positive by the rehearsal HBsAg confirmatory test for 0,75 % and in those of dry blood on filter paper, 6 out of those confirmed were reagent, what represents 0,57%.

**Conclusions.-** The results for both types of samples were compared and the index Kappa was of 0,85%, for a good agreement.

*(Rev Biomed 2003; 14:17-21)*

**Key words:** Hepatitis B virus, HBsAg, dried blood spot, UMELISA.

## INTRODUCCION.

En la infección con el virus de la hepatitis B (HBV) generalmente aparece en el suero el antígeno de superficie (HBsAg). Este marcador no es exclusivo de la fase aguda de la enfermedad, ya que puede persistir durante años en los portadores asintomáticos y en otras hepatopatías crónicas (1). Desde que Blumberg descubrió el HBsAg en 1965, los enzimoimmunoensayos (EIA) en suero para marcadores inmunológicos de las hepatitis virales han permitido el diagnóstico de la hepatitis B en los laboratorios (2).

Los EIA han sido empleados en la detección de HBsAg empleando muestras de sangre seca sobre papel de filtro (3,4), debido a las ventajas de este tipo de muestras ya que disminuye la utilización de materiales de laboratorios, no se necesita el uso de jeringuillas ni de centrifugas, el transporte del material biológico es más fácil, al no existir peligro de derrame, las muestras pueden enviarse por correo (5). Tampoco

se requiere de grandes espacios para la conservación de las muestras (6). La posibilidad de contaminación con el HBV también es menor, porque en estado seco este virus no se transmite aunque puede sobrevivir por largos períodos de tiempo en la sangre seca (7).

En este trabajo establecimos las condiciones óptimas para la elución de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro con el fin de realizar la detección de HBsAg en este tipo de muestra empleando el UMELISA HBsAg PLUS.

## MATERIALES Y METODOS.

### Muestra estudiadas.

Con el objetivo de evaluar la detectabilidad del ensayo, se prepararon muestras de sangre seca sobre papel de filtro a diferentes concentraciones de HBsAg, para ello se realizaron diluciones seriadas de los estándares ad y ay del HBsAg, procedente del Instituto Paul Ehrlich (Alemania), en sangre previamente procesada y cuyo nivel de hematocrito se ajustó al 40%. Las concentraciones preparadas fueron de 0; 0,5; 1; 2 y 4 UPEI/mL.

De cada uno de los puntos de concentración conocida de HBsAg, se dispensaron 100 L en las tarjetas de papel de filtro Schleicher & Schuell 903 (S & S 903), se secaron 2 h a 20°C y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Se analizaron 1053 muestras de donantes del Banco de Sangre Provincial de Ciudad de la Habana, Cuba.

### Colección de muestras de sangre en papel de filtro.

Las muestras de sangre seca sobre papel de filtro se obtuvieron por punción digital con una lanceta. Se colectaron en el papel de filtro S & S 903 como manchas circulares de aproximadamente 1 cm de diámetro, extendidas uniformemente por ambas caras del papel, en número de dos por cada individuo; se secaron a la temperatura del laboratorio (20-25°C) por espacio de 2 h y se conservaron por separado en sobres de papel a -20°C hasta la realización de la prueba. Para realizar la prueba se utilizó un disco de

### *Detección de HBsAg en papel filtro.*

5 mM de diámetro del centro de la mancha.

#### **Colección de las muestras de suero**

Se tomaron paralelamente muestras de sangre de la vena de cada uno de los individuos, la que se procesó hasta obtener el suero. Se conservaron a -20°C hasta la realización de la prueba.

#### **Establecimiento de las condiciones óptimas de elución de la sangre seca en papel de filtro.**

Para establecer las condiciones de óptimas de elución se utilizaron las muestras de sangre seca preparadas a diferentes concentraciones de HBsAg. Se evaluaron diferentes variantes para determinar la solución de elución más adecuada, el tiempo y temperatura de elución. El volumen de elución empleado fue de 40 µL.

- Soluciones de elución: solución salina 0,85% y Solución de lavado del UMELISA HBsAg PLUS (Tris -NaCl-Tween 20 25X) (R1).
- Variantes del tiempo: la elución de las muestras se realizó a 1 y 2 h.
- Variantes de temperatura: las temperaturas de elución fueron a 37°C y entre 20-25°C

Como óptimos se seleccionaron los parámetros que permitieron detectar siempre como positiva la muestra de 1 UPEI/mL. Con las condiciones seleccionadas, se evaluaron las muestras de suero y sangre seca de los donantes de sangre, para comprobar si los parámetros establecidos para la elución de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro fueron adecuados y analizar la factibilidad de usar este tipo de muestra para la detección de HBsAg con el UMELISA HBsAg PLUS.

#### **Procedimiento técnico.**

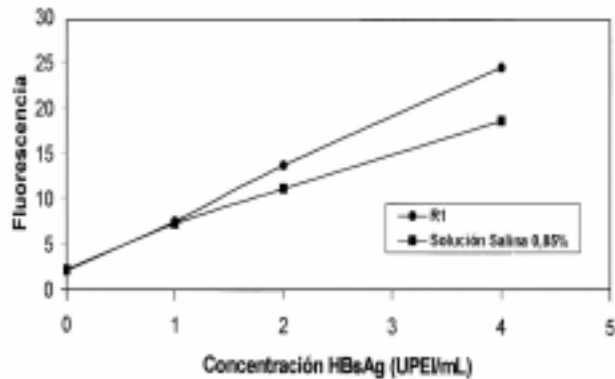
La evaluación de las muestras se realizó empleando el UMELISA HBsAg PLUS, el cual es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo "sandwich" que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la Estreptavidina y la Biotina.<sup>(8,9,10)</sup> En este ensayo se utilizó como fase sólida tiras de ultramicroELISA (10µL por pocillo), revestidas con anticuerpos monoclonales murinos de alta afinidad

dirigidos contra el determinante común "a" del HBsAg. Las muestras de suero o plasma se incubaron 1 hora a 37°C sin previa dilución en los pocillos de la tira de reacción. Las muestras de sangre seca en papel de filtro se eluyeron 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C), se transfirió 10 µL del sobrenadante de la elución a la placa de reacción, y se incubó en las mismas condiciones que las muestras de suero. A continuación, previo lavado, se añadieron anticuerpos monoclonales biotinilados específicos al HBsAg, se incubó 30 minutos a 37°C. Después de un nuevo lavado, se añadió el conjugado Estreptavidina/ fosfatasa alcalina (F.A) y se incubó 30 minutos a 37°C. Nuevamente se lavó y se adicionó el sustrato fluorogénico (4-metilumbeliferilfosfato). La lectura e interpretación de los resultados se realizó empleando el Lector PR-521 producido en el Centro de Inmunoensayo. La intensidad de la fluorescencia emitida permitió detectar la presencia de HBsAg en la muestra.

El ensayo del HBsAg confirmatory test se basa en el principio de neutralización, mediante el cual una muestra repetidamente positiva reacciona con un suero neutralizante (suero de conejo anti HBsAg positivo). Como referencia se utiliza un suero control, libre de anti HBsAg (suero conejo normal). Los anticuerpos en exceso neutralizan los determinantes antigénicos de la muestra, lo que es 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 del UMELISA HBsAg PLUS.

#### **Equipos.**

Para la lectura de la fluorescencia emitida se utilizó el lector PR-521 de la Tecnología SUMA acoplado a una computadora y para el lavado de las placas se empleó el Lavador MAS 301-M, ambos equipos son producidos en el Centro de Inmunoensayo, Ciudad de la Habana, Cuba.



**Figura 1.** Valores de fluorescencia de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro empleando diferentes eluyentes. (R1 = ver texto)

## RESULTADOS.

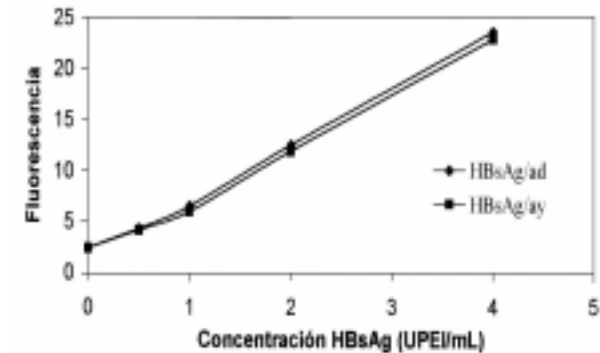
El comportamiento de la señal de fluorescencia para cada una de las concentraciones de HBsAg fue similar en las temperaturas y tiempos estudiados. Cuando se eluyó con R1 la pendiente de la curva fue mayor a la obtenida con Solución Salina (fig. 1).

Las condiciones óptimas de elución establecidas fueron:

- Tiempo de elución: 1 hora
- Temperatura de elución: temperatura ambiente (20-25°C)
- Solución de elución: solución de lavado UMELISA HBsAg (R1).

Con estas condiciones se logró detectar la muestra de 1 UPEI/mL para los subtipos ad y ay del HBsAg (fig.2).

Después de evaluar la población de donantes



**Figura 2.** Detectabilidad de UMELISA HBsAg PLUS para muestras de sangre seca sobre papel de filtro.

de sangre se encontraron 9 individuos reactivos en suero, para el UMELISA HBsAg PLUS. En el HBsAg CONFIRMATORY TEST 8 fueron confirmados positivos, para un 0,75% de positividad y uno resultó ser negativo en este ensayo confirmatorio, clasificándose como falso positivo (FP) del UMELISA HBsAg PLUS. Por otra parte, del total de muestras de sangre seca sobre papel de filtro 6 resultaron positivas lo que representa un 0,57% de positividad; los resultados de estas 6 muestras coincidieron en con sus homólogas en suero. Por el contrario, se encontraron 2 muestras, clasificadas como positivas en la variante de suero que no resultaron positivas en la prueba de sangre seca. En las muestras de sangre seca no se encontró ningún falso positivo. (cuadro 1)

El índice de correlación Kappa entre los resultados obtenidos con el UMELISA HBsAg

**Cuadro 1**  
**Resultados de las muestras de suero y de sangre seca sobre papel de filtro.**

UMELISA HBsAg PLUS	Muestras de suero	Muestras de sangre seca sobre papel de filtro
Positivo	9 *	6
Negativo	1044	1047
Total	1053	1053

\* 1 falso positivo

### *Detección de HBsAg en papel filtro.*

PLUS para muestras de sangre seca y sus parejas en suero fue de 0,85%.

#### **DISCUSIÓN.**

Las dos muestras positivas en suero no tuvieron este resultado en sus homólogas en sangre seca debido a que su concentración de HBsAg se encuentra por debajo de 1 UPEI/mL, que es el límite de detección para este tipo de muestra en el UMELISA HBsAg PLUS. Parkinson AJ y colaboradores coinciden con nuestros resultados en lo que se refiere a que la sensibilidad de la detección de HBsAg en muestras de sangre seca es menor cuando se compara con el plasma (3). El hecho de que la muestra clasificada como falso positivo en suero resultara negativa en sangre seca se debe a que en esta variante es necesario diluir la muestra para extraer el analito de interés y con ella el componente inespecífico de la muestra también se diluye. Otros autores (11) han reportado que en pruebas para detección de HBsAg en muestras de sangre seca no han encontrado resultados falsos positivos.

Este ensayo tuvo muy buena concordancia entre las muestras de suero y de sangre seca sobre papel de filtro, el índice de concordancia Kappa obtenido así lo demuestra, si tenemos en cuenta que los ensayos de muy buena concordancia son aquellos donde el índice de concordancia esta entre 0,81 y 1,00 (12,13).

Podemos concluir que es posible utilizar muestras de sangre seca sobre papel de filtro para la detección de HBsAg empleando el UMELISA HBsAg PLUS, este método puede ser empleado en investigaciones epidemiológicas en países en desarrollo y en aquellos lugares donde la población esta alejada de los centros de pesquisa ya que las muestras pueden ser enviadas por correo. Farghaly y Kotka también recomiendan este tipo de muestras para pesquisajes de HBsAg previo a las campañas de vacunación (4).

#### **REFERENCIAS.**

- 1.- Gold E. Hepatitis history. JAMA 1996; 31: 275.
- 2.- Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute viral hepatitis. In Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Editors. Harrison's principles of Internal Medicine. 15th edition. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1721-37.
- 3.- Parkinson AJ, McMahon BJ, Zanis L, Lanier AP, Wainwright RB. Deteccion of alpha-fetoprotein and hepatitis-B surface antige in blood spotted on filter paper: use as a screen for hepatocellular carcinoma in Alaska Natives. Arctic Med Res 1996; 55(3):123-8.
- 4.- Farghaly AM, Kotkat AM. Study of the sensitivy of blood spotted on filter paper in the detection of HBsAg and anticore using ELISA technique. J Egypt Public. Health Assoc. 1990; 65:391-400.
- 5.- Van den Akker B. Recovery of HIV antibodies in eluates from plasma and erythrocytes dried on filter paper and stored under various conditions. AIDS 1990; 4:87- 92.
- 6.- Behets F, Kashamuka M, Pappaioanou M, Green TA, Ryder R, Batter V, *et al.* Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. J. Clin. Microbiol 1992; 30:1179-82.
- 7.- Bond WW, Favero MS, Petersen NJ. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. Lancet 1981;II:550-1.
- 8.- Wolff W, Gelich WH. Direct radioimmunoassay of antibody against hepatitis B core antigen using 32-P-labelled core particles. Eur J Clin Microbiol 1984, 3:25-9.
- 9.- Al Awadi A, Hassan M, Adham K. The preparation of a new 57-cobalt-labelled thyroxine for use in single/dual radioimmunoassay techniques. J Immunol Methods 1988; 108:27-32.
- 10.- Rosendale BE, Jarrett DB. Biosynthesized 35-S methionine-labelled pro-opiomelanocortin peptides as novel recovery markers in radioimmunoassay of peptide hormone. Clin Chem 1985; 31:1965-9.
- 11.- Villa E, Cartolari R, Bellentani S, Rivasi P, Casolo G, Maneti F. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research. J Clin Pathol 1981; 34:809-12.
- 12.- Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 3erd edition Boston: PWS Kent Publishing Company; 1990.
- 13.- Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hail; 1991.