

Bioquímica

Volumen 27
Volume

Número 4
Number

Diciembre 2002
December

Artículo:

Estabilidad de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.Medigraphic.com

Estabilidad de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro

Aurora Delahanty-Fernández*, Irinia Valdivia-Álvarez, Julio Ventura-Paz, Darién Ortega-León, Janette Trujillo-Brito, Ariel Palenzuela-Díaz, Yulegsia Tallo-Vila

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

**Sobretiros: Laboratorio de Hepatitis. División de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo. Calle134 y Avenida 25. Cubanacán. Playa. Ciudad de la Habana, Cuba. Email: iqhbsag@cie.sld.cu*

Recibido: 20/12/01 Aceptado: 11/10/02

Resumen

Se evaluó la estabilidad de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro. Tres preparaciones de diferentes concentraciones fueron depositadas en papel filtro Schleicher and Schuell 903 (S&S 903), secadas 24 horas en dos condiciones: a 15°C y 55% de humedad relativa y a 20°C y 89% de humedad relativa y conservadas en sobres de papel bajo cuatro condiciones de temperatura: -20, 4, 20-25°C y 36°C. Las pruebas para la detección de HBsAg se realizaron con el empleo del UMEHISA HBsAg PLUS a partir del tiempo 0 hasta 180 días después de la preparación de las muestras.

Se observó que las muestras secadas a 15°C y 55% de humedad relativa se pudieron almacenar cinco meses a 4°C y -20°C, dos meses entre 20 y 25°C y un mes a 36°C. Las muestras secadas a 22°C y 89% de humedad relativa se pudieron almacenar durante cinco meses a 4°C y -20°C. Cuando se conservaron entre 20 y 25°C y a 36°C a partir del tercer mes el HBsAg se tornó negativo.

Palabras claves: HBsAg, Sangre seca sobre papel de filtro, UMEHISA, Estabilidad.

Abstract

Stability of dried blood samples on filter paper for the detection of HBsAg, stored at different conditions, was assessed. Drops from three samples with different concentrations of HBsAg were spotted on filter paper Schleicher and Schuell 903 (S&S 903), dried for 24 hours at 15°C and 55 % of relative humidity, or at 20°C and 89 % of relative humidity. The dried blood samples were stored in paper envelopes at four different temperatures: -20°C, 4°C, 20-25°C and 36°C and they were tested by UMEHISA HBsAg PLUS from 0 to 180 days after preparation.

Dried samples at 15°C and 55 % of relative humidity could be stored during five months at 4°C and -20°C, two months at 20-25 °C relative humidity and one month at 36°C. Dried samples at 20°C and 89 % of relative humidity could be stored for five months at 4°C and -20°C. Samples became completely negative for HBsAg after three months when stored at 20-25°C and 36°C.

Key words: HBsAg, Dried blood spot, UMEHISA, Stability.

Introducción

La hepatitis B continúa siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes, no sólo por su gran prevalencia a nivel mundial, (se calcula en 300 millones el número de personas infectadas), sino también, por su tendencia a la cronicidad, su relación con la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular. Además, es de gran importancia para su prevención los aspectos clínicos-terapéuticos, así como los epidemiológicos. Se considera un problema de salud que mantiene el interés de muchos investigadores en las últimas décadas. ¹

La detección de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) es ampliamente empleada en investigaciones epidemiológicas de la infección por virus de la hepatitis B (HBV). Sin embargo, investigaciones a gran escala requieren facilidades

que no están disponibles en países donde la infección por el HBV es endémica. Además, los problemas se incrementan cuando la población bajo investigación se encuentra alejada del centro donde se realizarán los estudios.

Es por eso que se necesita un método simple y confiable para adquirir y transportar las muestras.² El empleo de muestras de sangre seca sobre papel filtro, ofrece varias ventajas entre ellas esta que no hace falta un adiestramiento especial para la toma de muestras, la cual se hace por punción digital del talón o del lóbulo de la oreja con una lanceta, no hay que centrifugar ni refrigerar las muestras, el transporte se facilita al no haber peligro de derrame del material biológico recogido. Las muestras pueden enviarse por correo, la infectividad del HBV disminuye en las preparaciones de sangre seca en papel filtro respecto a las muestras líquidas ⁽³⁾ y los riesgos de adquirir accidentalmente algún agente infeccioso presente

en las muestras por rotura de la cristalería son eliminados.^{4,5} Además, se facilita la conservación de muestras testigos por largos períodos, aún si se dispone de escasa capacidad de refrigeración.⁶ Estas ventajas son de gran importancia en aquellos países donde la infección por el HBV es endémica y los recursos son limitados para realizar estudios epidemiológicos.

Sin embargo, puede mediar tiempo entre la toma de la muestra y la realización de la prueba en el laboratorio, lo que provoca que las manchas de sangre queden expuestas al calor y la humedad, parámetros que pueden afectar los resultados de la prueba.

En este trabajo se evaluó la estabilidad del HBsAg en manchas de sangre seca sobre papel de filtro en diferentes condiciones de secado y almacenamiento, dada la importancia de la estabilidad del analito en la efectividad de programas de pesquisa de la infección por el HBV.

Materiales y métodos

Preparación de las manchas de sangre en papel filtro: Se realizaron diluciones seriadas de los estándares ad y ay del HBsAg, procedentes del Instituto Paul Ehrlich (Alemania), en sangre previamente procesada y cuyo nivel de hematocrito se ajustó al 40%. Las concentraciones preparadas fueron 1,2 y 4 UPEI/mL.

Se dispensaron 100 μ L de cada uno de los puntos de concentración de HBsAg en tarjetas de papel filtro Schleicher & Schuell 903 (S&S 903).

Secado y almacenamiento de las muestras: Estas tarjetas se dejaron secar 24 horas en dos variantes diferentes de temperatura (T) y humedad relativa (HR):

Variante 1 (V1): T = 15°C y HR 55%

Variante 2 (V2): T = 20°C y HR 89%

Todas las muestras secas fueron guardadas en sobres de papel y almacenadas en cuatro condiciones diferentes:

Condición 1 (C1): -20 °C

Condición 2 (C2): 4°C

Condición 3 (C3): Temperatura ambiente (20-25°C)

Condición 4 (C4): 36°C

Con el empleo del perforador P-51 se cortaron discos de 5 mm de diámetro de la zona central de la mancha de sangre.

Procedimiento técnico: La evaluación de las preparaciones 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.^{7,8,9} En este ensayo se utilizaron como fase sólida tiras de ultramicroELISA (10 μ L 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, los anticuerpos en la superficie de la misma capturan el HBsAg si éste se encuentra presente. Las muestras de sangre seca en papel filtro se eluyeron 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C), se transfirió 10 μ L del sobrenadante de la elución a la placa de reacción, incubándose 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. Una vez eliminado el exceso de los anticuerpos biotinilados, se añadió el conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina (FA) y luego de incubar durante 30 minutos a 37°C 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.¹⁰

Estabilidad de las muestras: Para evaluar la estabilidad de las muestras, las tarjetas se probaron inmediatamente después de las 24 horas de secado, el cual se consideró como tiempo cero. Además, las muestras se probaron los días 1, 2, 3, 7 de la primera semana, los días 15, 30 del primer mes y después cada 30 días durante 5 semanas.

Análisis estadístico

Se calcularon los porcentajes (%) de recuperación para cada una de las muestras, tomando como referencia el valor de fluorescencia del tiempo cero. Las muestras se consideraron estables cuando el % de recuperación fue mayor o igual a 80%.¹¹

Se determinaron las medias y las desviaciones estándar de cada una de las concentraciones a tiempo cero, en las dos variantes de secado. Para el análisis estadístico se aplicó la prueba F de Fischer de Microsoft Excel versión 5.0, en las dos variantes de secado.

Resultados

Se obtuvieron 12 tarjetas en sangre seca para cada una de las concentraciones de HBsAg. Los resultados de la media y desviación estándar, en el tiempo cero, se muestran en el cuadro 1. Los valores de las medias de fluorescencia se consideraron como referencia para cada una de las variantes de secado.

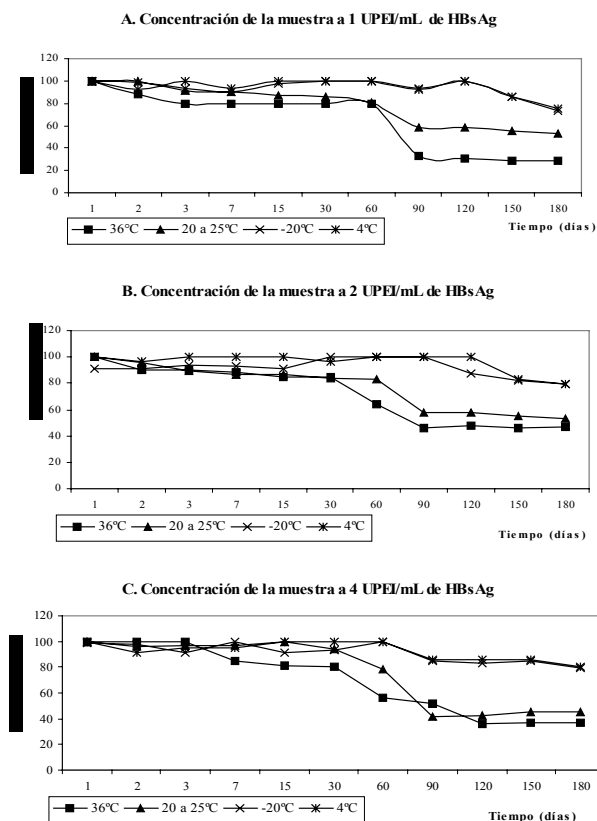


Figura 1. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro (Secado: T 15°C y HR 55%).

Al realizar un análisis estadístico, para un nivel de significancia de 0,25 %, se comprobó que existe una diferencia significativa entre ambos grupos de valores de las variantes de secado.

En la figura 1 se muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el HBsAg en las tarjetas de sangre seca, para la variante 1. Se aprecia que los porcentajes de recuperación para

Cuadro 1. Media de la fluorescencia y desviación estándar para el tiempo 0, en las dos variantes de secado.

Concentraciones	V1		V2	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
1 UPEI/mL	8.25	0.63	9.55	1.13
2 UPEI/mL	14.8	4.03	15.7	1.13
4 UPEI/mL	32.65	1.06	31.8	2.82

“O” 24 horas post-secado.

V1- 15°C; 56% de humedad

V2- 20°C; 89% de humedad

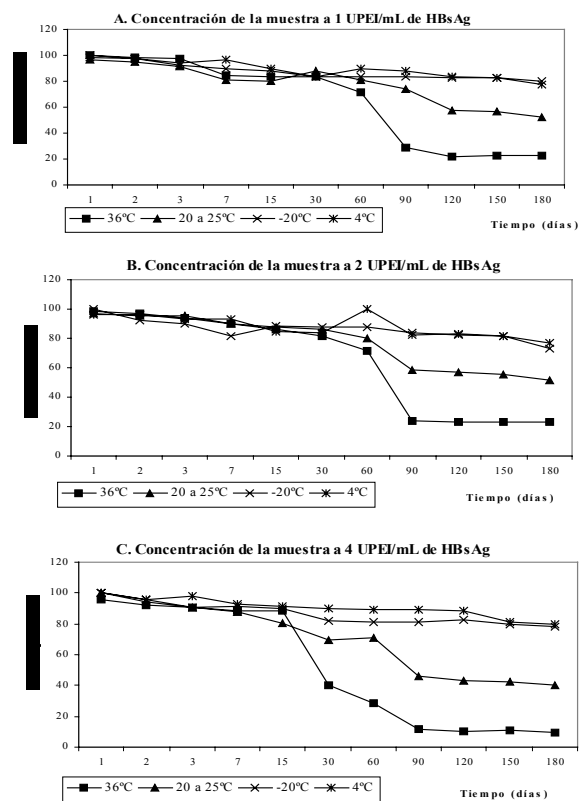


Figura 2. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad del HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro (Secado: T 20°C y HR 89%).

las tres concentraciones son mayores de 80% durante 5 meses cuando se conservan a 4°C y -20°C, sólo de 2 meses si la temperatura de almacenamiento está entre 20 y 25°C y de 1 mes si es de 36°C. Todas las muestras fueron positivas durante el tiempo que el porcentaje de recuperación fue mayor de 80%.

Las tarjetas secadas con la variante 2, se pudieron conservar 5 meses a 4°C y -20°C, aquí los porcentajes de recuperación también estuvieron por encima de 80%, como se observa en la figura 2, y las tres muestras resultaron positivas. Cuando se conservaron tres meses a temperatura ambiente (20 a 25°C) o a 36°C, los porcentajes de recuperación fueron inferiores al 80% y el HBsAg presente en las muestras se tornó negativo.

Discusión

La diferencia significativa entre ambos grupos de valores de las variantes de secado sugiere que se deben controlar las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el secado de las muestras, tratando de mantenerlas alrededor de 15°C y 56 % respectivamente para evitar que se produzcan pérdidas de actividad del antígeno. Se

recomienda no exponerlas al sol ni calentarlas, porque la temperatura alta desnaturaliza las proteínas y las fija al papel, y esta puede ser la causa de la no elución de las muestras.¹²

La estabilidad del HBsAg en manchas de sangre seca sobre papel filtro disminuye según las condiciones de almacenamiento. Cuando se conserva a temperatura ambiente y a 36°C la pérdida de HBsAg es mayor, al compararlo contra el tiempo cero, lo que puede deberse a la pérdida de actividad del antígeno a estas temperaturas para ese tipo de muestra. Esto puede influir en los estudios epidemiológicos de la hepatitis B.

Cuando estas muestras fueron conservadas por más de 5 meses a 4 y -20°C, disminuyeron sus valores de fluorescencia, lo que pudo estar influenciado por la pérdida del HBsAg al exceder el tiempo de conservación para estas temperaturas. Estos resultados son muy similares a los reportados por Villa y cols en 1981⁽²⁾ para muestras positivas a HBsAg, donde también demostraron que muestras de sangre seca de pacientes anti-HBc positivos tuvieron una ligera pérdida de la actividad después de 30, 60, 180 días de almacenamiento a 4 y -20°C en comparación con los sueros de estos pacientes.

En estudios previos de estabilidad de muestras de suero positivas a HBsAg, se encontró que estas pueden ser conservadas 18 meses a 4°C, en estos estudios los porcentajes de recuperación fueron superiores al 95%.

Referencias

1. Maynard JE. Hepatitis B: Global importance and need for control. *Vaccine* 1990; 8: 18-20.
2. 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 (7): 809-812.
3. 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.
4. Evengaard B. Effect of heat on extracted HIV infectivity and antibody activity using the filter paper technique of blood sampling. *AIDS* 1989; 3: 591-595.
5. Chanchancherd P, Brown AE, Trichavaroj R, Tienamporn P, Puthakird P, et al. Application of dried blood spot specimens for serologic subtyping of human immunodeficiency virus type 1 in Thailand. *J Clin Microbiol* 1992; 37(3): 804-806.
6. Behets F, Kashamuka M, Pappaioanou M, Green TA, Ryder R, 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: 1179-1182.
7. 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: 25-29.
8. 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.
9. 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: 1965-1969.
10. Literatura interior UMEHISA HBsAg PLUS. Centro de Inmunoensayo 2001; 1-12. No. de inscripción D 0007-10.
11. Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. Quantitative tests. 3rd Draft, 1986.
12. Marrero N, González Y, Fometa A, Lechuga MF. Estabilidade de tiroxina (T4) em manchas de sangue seco sobre papel de filtro. Impacto na pesquisa neonatal de hipotireoidismo congênito. *NewsLab* 1998; 26: 50-60.

