



Kit de HBcAb en ELISA

Cat. No. ITP21501

USO PREVISTO

El kit de prueba Advanced HBcAB es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas para la determinación cualitativa del anticuerpo central de la hepatitis B (HBcAB) en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La prueba Advanced HbcAB es un inmunoensayo competitivo basado en ELISA, que inmoviliza el antígeno recombinado específico en la parte inferior de los pocillos de microtitulación. El Anti-HBc específico se acopla con la peroxidasa de rábano (HRP) como la solución del conjugado. Durante el ensayo, tanto el HBcAb existente en la muestra como la solución del conjugado van a reaccionar con el antígeno inmovilizado y a competir entre sí. Ellos formarán un inmuno-complejo "antígeno-HBcAb-HRP" o "antígeno-HBcAb". Después de que el material no unido se elimina mediante lavado durante el procedimiento de ensayo, el sustrato se aplica para indicar el resultado de la prueba. La aparición del color azul en los pocillos de microtitulación indica un resultado HBcAb no reactivo. La ausencia del color indica un resultado reactivo en la muestra.

CONTENIDOS DEL KIT

1. Placa de microtitulación revestida	96T/12 pocillos	96T/8 pocillos
2. Conjugado de Enzima	7 ml	9 ml
3. Control Positivo	1 ml	1 ml
4. Control Negativo	1 ml	1 ml
5. Color A (Solución H ₂ O ₂)	7 ml	14 ml
6. Color B (Sustrato TMB)	7 ml	14 ml
7. Solución de Parada	7 ml	14 ml
8. Buffer de Lavado Concentrado (20X)	25 ml	25 ml
9. Sellador de Placa	2 pcs	2 pcs
10. Bolsa Plástica	1 pc	1 pc
11. Prospecto	1 versión	1 versión

(Los artículos arriba mencionados deben ser almacenados a una temperatura de 2~8°C).

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas con capacidad de 1~1000 µl
2. Puntas de pipeta
3. Incubador a 37°C
4. Agua deionizada o destilada (agua purificada)

5. Lavador de placas de microtitulación

a. Placa de microtitulación o lector de bandas con longitud de onda de medida 450 nm y filtro de referencia (615 - 690 nm)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. ESTE PRODUCTO ES PARA DIAGNOSIS IN VITRO SOLAMENTE
2. Solo médicos o técnicos médicos deben manejar este kit de reactivos
3. Agite suavemente cada reactivo antes de la prueba
4. No usar este kit después de la fecha de vencimiento
5. No mezclar reactivos de diferentes lotes
6. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos
7. Evite la exposición de la solución TMB a la luz fuerte, metal u oxidantes. Esta debe ser incolora, de lo contrario debe ser descartada.

INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

1. ADVERTENCIA- MATERIALES DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO: ESTE KIT CONTIENE COMPONENTES DE SANGRE HUMANA, MANEJARLOS COMO CAPACES DE TRANSMITIR AGENTES INFECCIOSOS. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que los productos derivados de material de origen humano no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos, se recomienda que estos reactivos y muestras humanas sean manejados con prácticas de trabajo de laboratorio bien establecidas. El Control Positivo ha sido inactivado por tratamiento térmico.
2. No fumar ni comer en las zonas donde las muestras o kits que sean manipuladas.
3. No pipetear con la boca. Usar guantes desechables de PVC cuando maneje reactivos o muestras, y lavarse bien las manos con hipoclorito de sodio al 5%.
4. Las muestras infecciosas y los derrames que contengan no ácidos deben ser limpiados a fondo con hipoclorito de sodio al 5%.
5. Todos los materiales de desecho deben desinfectarse adecuadamente antes de su eliminación. Tanto los residuos líquidos como los sólidos debe ser autoclavados a 121°C durante al menos 1 hora. Los desechos sólidos también pueden ser incinerados. Los residuos líquidos no ácidos pueden ser diluidos a una concentración final de 1.0%. Los desechos líquidos ácidos requieren neutralización antes de un tratamiento similar y deben reposar durante 30 minutos para obtener una desinfección eficaz.
6. Evite el contacto de la solución de parada con la piel o las membranas mucosas. Si entra en contacto con la piel, lavar con agua del grifo inmediatamente.

RECOLECCION DE MUESTRAS Y ALMACENAJE

1. Recoger muestras de suero y plasma siguiendo los procedimientos de laboratorio clínico regulares. Separar el suero del coágulo o el plasma de los glóbulos rojos tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.

2. Las muestras que contienen azida de sodio o partículas pueden dar resultados erróneos.
3. Las muestras deben ser refrigeradas si no se utilizan dentro de los 3 días de la recogida. Evite la congelación y descongelación de las muestras más de 2-3 veces antes de usar.

ALMACENAJE DEL REACTIVO

1. El kit debe ser almacenado a 2-8 °C. Utilice los reactivos tan pronto como sea posible después de desempacar el kit.
2. Devuelva los reactivos al congelador inmediatamente después de su uso.
3. Si la placa no se utiliza por completo, cubra los pocillos no utilizados con el sellador de placas, póngalos en la bolsa de plástico junto con el desecante y guárdela a 2~8°C.
4. El buffer de lavado concentrado debe ser almacenado a temperatura ambiente para evitar la cristalización. Si el cristal se ha precipitado antes de su uso, calentar la solución en un baño de agua a 37-40°C hasta que se disuelva el cristal.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. Diluir 1 volumen de buffer de lavado concentrado con 19 volúmenes de agua deionizada o destilada. Mezclar bien.
2. El buffer de lavado debe ser almacenado a temperatura ambiente durante 1 semana.

PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

1. Lleve todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (18~25°C) antes del ensayo. Agitar suavemente antes de su uso. Ajustar una incubadora a 37±1°C.
2. Anote el número de especímenes y pocillos en la ficha de datos. Dos pocillos para los espacios en blanco, cinco pocillos adicionales para los controles y un pocillo para cada muestra.

Nota: Cubra los pocillos no usados con sellador de placas, séllelos en la bolsa plástica con el desecante y almacénelos a 2~8°C.

3. Añadir 50µl de control (3 controles negativos y 2 controles positivos) y cada muestra dentro de los pocillos respectivamente (reserve 2 pocillos para los espacios en blanco).
4. Añadir 50µl del conjugado de enzima dentro de cada pocillo de muestra y de control excepto por el espacio en blanco.

Nota: No toque el borde de los pocillos para evitar resultados falsos.

5. Golpee suavemente la placa para mezclar profundamente el líquido en los pocillos, no salpicar líquido sobre la combinación.
6. Incubar la placa en una incubadora a 37°C durante 60 minutos en una incubadora. Balancee la placa a temperatura ambiente por 5 minutos.
7. Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado:
 - a. El lavado debe realizarse estrictamente de acuerdo con las instrucciones, un lavado incompleto puede causar un falso resultado.
 - b. Aspirar completamente los contenidos de los pocillos en un frasco de residuos. Luego llenar los pocillos con buffer de lavado (350µl o más), evitar el desbordamiento. Dejar en

remojo (aprox. 30-60 segundos). Aspirar completamente y repetir el lavado y el procedimiento de remojo cuatro veces adicionales para un total de cinco lavados.

c. Asegúrese de que ningún líquido permanece en el soporte de bandas y recorte después de la última aspiración (por ejemplo, mediante secado con papel absorbente).

Nota: Un lavado inadecuado causará un resultado falso.

8. Añadir 50µl del color A y 50 µl del color B a cada pocillo.
9. Incubar la placa a 37°C por 15 minutos.
10. Añadir 50 µl de solución de parada dentro de cada pocillo, golpee suavemente la placa.
11. Medir el OD con un lector ELISA a 450 nm (longitud de onda única) o 450 nm y 630 nm como referencia (doble longitud de onda).

CALCULOS Y RESULTADOS

1. Absorbancia promedio del Control Negativo (NCx).

$$NCx = (NC1+NC2+NC3)/3$$

Eliminar cualquier NC menor que 0.05.

Absorbancia promedio del Control Positivo (PCx):

$$PCx=(PC1+PC2)/2$$

Eliminar cualquier PC mayor que 0.2

2. Valor de corte:

Para el suero humano principal: Corte=0.2 x NCx

Para el suero humano 1:30: Corte=0.5xNCx

3. Dividir la absorbancia de la muestra por el valor de corte.

Positivo: la absorbancia de la muestra es menor que o igual a (\leq) el valor de corte.

Negativo: la absorbancia de la muestra es mayor que ($>$) el valor de corte.

**El resultado del suero humano principal en este kit tiene el significado estadístico de epidemiología, mientras que el resultado del suero humano 1:30 en este kit puede ser usado como una determinación cualitativa en diagnóstico clínica.

**El suero diluido o el espécimen de control debe ser detectado como Control Negativo o Positivo, es decir, añadir 100µl de cada muestra de control o suero diluido dentro de cada pocillo y 50 µl de solución de trabajo de conjugado de enzima dentro de cada pocillo de muestra.

SENSIBILIDAD ANALITICA (DETECTABILIDAD DE LIMITE) 2NCU/ml.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Repetir la prueba en duplicado de una muestra encontrada reactiva por el procedimiento de cribado verificará si es un repetidamente reactivo. Si ninguna de las pruebas repetidas es reactiva, la muestra debe ser considerada negativa. Si la muestra es reactiva en

cualquiera de las pruebas repetidas, la muestra debe ser considerada repetidamente reactiva y probada por una prueba confirmativa.

Un falso resultado reactivo puede ser causado por:

- a. El arrastre de una muestra altamente reactiva debido a la contaminación con equipos o puntas de pipetas.
- b. Contaminación del sustrato con iones metálicos.
- c. La contaminación cruzada.
- d. Lavado inadecuado o aspiraciones durante el procedimiento de lavado.
- e. Fallo al remover el exceso de humedad desde el fondo del pozo.

BIBLIOGRAFIA

1. Engvall E, and Perimann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem*, 8:871-874, 1971
2. Engvall E, and Perimann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the Nineteenth Colloquium. Brugge (Peeters H., ed.) Pergamon Pre, Oxford, PP. 553-556, 1971.
3. Engvall E, Jonsson K, and Perimann P. Enzyme-linked immunosorbent Assay II. Quantitation Assay of Protein antigen, immunoglobulin G. by means of enzyme-labeled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim. Biophys. Acta* 251: 427-434, 1971.
4. VanWeemen BK, and Schuurs AHWM Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS Letters* 15: 232-236, 1971.
5. Wisdom GB. Enzyme-immunoassay, *Clin. Chem.* 22: 1234-1255, 1976.
6. Wolters G, Kuijpers, L, Kacaki J, and Schuurs A. Solid-phase enzyme-immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen, *J. Clin. Pathol.* 29:873-879. 1976.
7. Wei R, Knight GJ, Zimmeman DH, and Bond HE, Solid-phase enzyme-immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen, *Clin. Chem.*, 23:813-815, 1977.
8. David GS, Present W, Martinis J, Wang R, Bartholomew R, Desmond W, and Sevier ED, Monoclonal antibodies in the detection of hepatitis infection, *Med. Lab. Sci.* 38:341-348, 1981.
9. Drouet J, Courouze A-M, Kalil J., Ropars C, Felious M, Monoclonal antibodies to HBsAg produced by murine hybridomas. (in) *Viral Hepatitis* (Szmuness, W., Alter, H.J., Maynard, J. E., eds.) Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 706-707, 1982.
10. Goodall AH, Miescher G, Meek FM, Janossy G, Thomas G, Thomas HC. Monoclonal antibodies in a solid-phase radiometric assay for HBsAg *Med. Lab. Sci.* 38: 349-354, 1981.
11. Kennedy RC, Loniscu-Matiu I, Alder-Alder-Storthz K, Henkel RD, Sanchez Y, Dreesman GR. Characterization of Anti-Hepatitis B Surface Antigen Monoclonal Antibodies, *Intervirology.* 19: 176-180, 1983.
12. Shih JW-K, Cote PJ, Dapolito GM, and Gerin JL. Production of monoclonal antibodies against Hepatitis B surface antigen (HBsAg) by somatic cell hybrids, *J. Virol. Meth.* 1: 257-273, 1980.

13. Wands JR, Zurawski VR, High Affinity Monoclonal Antibodies to Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Produced by Somatic Cell Hybrids, *Gastroenterology* 80: 225-232, 1981.
14. US Environmental Protection Agency. EPA guide for infectious waste management. Washington, DC: May, 1986.
15. Centers for Disease Control Recommendations for prevention of HIV transmission in health care settings. *MMWR* 36, Supplement No. 2S, 1987.
16. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, and Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of Hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl. and Envir. Microbial.*, 42: 762-767, 1981.
17. Mehan BH, University Chemistry, Second Edition, Addison Wesley, p. 648, 1968.
18. Grangeot-Keros L, Lamber T. Dubreuil P, Briantais MJ, and Pillot J: False Reactions in Radioimmunoassay for Viral Hepatitis B Markers in Patients Suffering from Coagulation Disorders. *Vox. Sang:* 42: 160-163, 1982.
19. Technical Manual of the American Association of Blood Banks, Eighth Edition, Philadelphia, J.B., Lippincott Co., p. 216, 1981.
20. Epidemiologic Notes and Reports, Hepatitis B Contamination in a Clinical Laboratory-Colorado, *MMWR* 29: 459-565, 1980.

InTec PRODUCTS, INC.