



CAT. NO. ITP 21003
01.05.03.931-1 40502

HBsAG

KIT DE DIAGNÓSTICO PARA EL VIRUS HEPATITIS B ANTIGENO DE SUPERFICIE (ELISA)

PARA USO PROFESIONAL

Este prospecto debe leerse cuidadosamente antes del uso del producto. Las instrucciones deben seguirse cuidadosamente. La fiabilidad de los resultados del ensayo no se puede garantizar si hay cualquier desviación de las instrucciones de este prospecto.

USO PREVISTO

El Kit ADVANCED de diagnóstico para el virus de la Hepatitis B antígeno de superficie es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cualitativa de la hepatitis B antígeno de superficie (HBsAg) en suero humano o plasma. Está destinado para la criba de donantes de sangre y para el diagnóstico de los pacientes relacionados con la infección por el virus de la Hepatitis B.

COMPENDIO

Las infecciones con el virus de la hepatitis B (VHB) presentan graves problemas de salud pública en todas partes del mundo. La detección temprana de la infección es esencial. Una variedad de marcadores serológicos aparecen después de la infección con VHB, y el primero de estos es HBsAg. Este antígeno aparece ante evidencia bioquímica de la enfermedad hepática o ictericia, persiste a lo largo la fase de la enfermedad aguda, y disminuye durante la convalecencia.

Los procedimientos para la detección de HBsAg han evolucionado desde los relativamente insensibles métodos de difusión en gel de agar para el inmunoensayo enzimático. En 1975, Wolters et al. publicó un procedimiento ELISA para la detección de HBsAg en microplacas. Con este procedimiento se reportó que la sensibilidad es equivalente al radioinmunoensayo en un panel de sueros de referencia. Posteriormente, el procedimiento ELISA se ha aplicado ampliamente en la detección de antígenos y anticuerpos.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El Kit ADVANCED de diagnóstico para el virus de la Hepatitis B de antígeno de superficie es un inmunoensayo "sándwich" de doble anticuerpo basado en ELISA, que emplea anticuerpos anti-HBsAg específicos: anticuerpo monoclonal para HBsAg immobilizado en la parte inferior de los pocillos microtituladores, y el anticuerpo policlonal para HBsAg emparejado con peroxidasa de rábano (HRP) como la solución de conjugado. Durante el ensayo, el HBsAg existente en la muestra reaccionará con estos anticuerpos para formar un inmunocomplejo "anticuerpo-HBsAg-antibody-HRP. Después de que el material no unido sea 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 reactivo HBsAg. La ausencia de color indica resultado no reactivo en la muestra.

CONTENIDOS DEL KIT

1	Placa de pocillo microtitulador	1 placa (96T)
	1 placa de 96 pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal de ratón para HBsAG	
2	Conjugado de enzima	1 x 9 ml
	Un buffer rojo conteniendo peroxidasa de rábano etiquetado como anticuerpo de cabra para HBsAG	
3	Control positivo	1 x 1 ml
	Un buffer de proteína estabilizada conteniendo HBsAG	
4	Control negativo	1 x 1 ml
	Un buffer de proteína estabilizada probado no reactivo con HBsAG	
5	Diluyente de muestra	1 x 4 ml
	Buffer verde conteniendo proteína estabilizada	
6	Color A	1 x 14 ml
	Solución de peróxido de hidrógeno. Lista para usar.	
7	Color B	1 x 14 ml
	Solución TMB. Lista para usar.	
	Todos los artículos arriba mencionados deben ser almacenados a 2~8°C	
8	Solución de parada	1 x 14ml
	Lista para usar.	
9	Buffer de lavado concentrado (20x)	1 x 25ml
	20 x PBS – T buffer, PH 7.4 DILUIR ANTES DE USAR	
10	Sellador de placa	3 pcs
	Para cubrir las placas durante la incubación para prevenir la evaporación o la contaminación de los pocillos	
11	Bolsa plástica	1 pc
	Para anexas las bandas sin usar	
12	Prospecto	1 copia

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas con capacidad de 1~1000µl
2. Puntas de pipetas
3. Incubadora a 37°C
4. Agua fresca deionizada y destilada
5. Lavador de placas de microtitulación

6. Placa de Micro-pocillo o lector de bandas con una sola longitud de onda (450 nm) o doble longitud de onda (450 nm y longitud de onda de referencia 615-690nm, por ejemplo, 630 nm).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Solo para uso profesional
2. Los reactivos son solo para diagnóstico in vitro
3. Agitar suavemente cada reactivo líquido 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 Color B 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.

1. No fumar ni comer en las zonas donde las muestras o kits sean manipuladas.
2. No pipetear con la boca. Usar guantes desechables de PVC cuando maneje reactivos o muestras, y lavarse bien las manos cuando termine.
3. Los materiales usados para limpiar derrames, incluyendo los guantes, deben ser desechados como residuos de potencial riesgo biológico. No autoclavar los materiales que contengan hipoclorito de sodio. 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.
4. Evite el contacto del ácido sulfúrico 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. Recolección de muestras:

Deben usarse muestras de suero y plasma que contengan dosis normales de anticoagulantes comunes, tales como plasma de citrato de sodio, plasma EDTA o plasma citrato. La sangre recogida por punción venosa debe permitirse coagular naturalmente. Asegúrese de que las muestras de suero estén totalmente coaguladas. Retire cualquier partícula visible de la muestra por centrifugación. No calentar las muestras inactivadas, esto puede causar deterioro de las proteínas objetivo en la muestra. Las muestras que contengan azida de sodio pueden dar resultados erróneos.

2. Transportación y Almacenaje

Si no son examinadas de inmediato, las muestras de suero o plasma deben ser refrigeradas a 2-8°C. Para un período de almacenamiento de más de 3 días, se recomienda la congelación (-15°C o inferior). Se deben evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Las muestras deben ser llevadas a temperatura ambiente y bien mezcladas antes de la prueba.

ALMACENAJE DE LOS REACTIVOS

1. El kit debe ser almacenado a 2~8°C. Usar los reactivos tan pronto sea posible después del primer uso.
2. Devolver los reactivos al congelador inmediatamente después del uso.
3. Si no se usa por completo toda la placa, cubra los pocillos sin usar con el sellador de placas, ponerlos en la bolsa plástica junto con el desecante y almacene a 2~8°C.
4. El buffer de lavado concentrado debe ser almacenado a temperatura ambiente para evitar la cristalización. Si el cristal ha sido precipitado antes de su uso, caliente la solución en un baño de agua a 37~40°C hasta que el cristal se disuelva.

PREPARACION DE REACTIVOS

Buffer de lavado:

- a. Diluir una porción de buffer de lavado concentrado con 19 porciones de agua deionizada o destilada. Mezclar bien.
- b. El buffer de lavado debe ser almacenado a temperatura ambiente por una semana.

PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

PROCESO SEMIAUTOMATICO

1. Lleve todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (18~25°C) para el ensayo. Agitar suavemente antes de su uso.
2. Prepara los números necesarios de pocillos, incluyendo un pocillo para los espacios en blanco, dos pocillos para el control negativo, dos pocillos para el control positivo y un pocillo para cada espécimen. Anote los números de series para los controles y especímenes en la ficha de datos.
3. Añadir 20µl del espécimen de diluyente en cada pocillo.
4. Añadir 100µl de especímenes, control negativo y control positivo para cada pocillo apropiado de acuerdo a la ficha de datos. (Reserve 1 pocillo para el espacio en blanco).
5. Golpee suavemente la placa para mezclar.

Nota: No salpicar líquido dentro de la combinación.

6. Incubar la placa en un baño de agua a 37°C ó en incubadora por 60 minutos.

7. Añada 50 µl de solución de trabajo de conjugado de enzima a cada pocillo.

Nota: No tocar el borde del pocillo para evitar falsos resultados.

8. Incubar la placa en un baño de agua a 37°C ó en incubadora por 30 minutos.

9. Lave bien cada pocillo cinco veces con buffer de lavado según el procedimiento de lavado:

- a. El lavado debe ser ejecutado estrictamente de acuerdo a las instrucciones, ya que un lavado incompleto afectaría adversamente el resultado de la prueba.
- b. Aspire los contenidos del pocillo completamente dentro de un frasco de residuos. Luego llene los pocillos con buffer de lavado (350 µl ó más). Evite el desbordamiento.
- c. Asegúrese de que no quede ningún fluido en el soporte de bandas ni en las bandas después de la última aspiración (por ej. secando con papel absorbente).

Nota: Un lavado inapropiado puede causar un falso resultado.

10. Añadir 50µl de Color A y 50µl de Color B a cada pocillo en orden. Agite la placa para mezclar.
11. Incubar la placa en un baño de agua a 37°C o en incubadora por 30 minutos.
12. Detener la reacción añadiendo 50µl de solución de parada a cada pocillo (mantener la misma secuencia de pipeteo e intervalos de tiempo usados para los colores A/B). Agite la placa para mezclar.
13. Lea la absorbancia de la solución en cada pocillo a 450 nm (longitud de onda única) ó 450 y 630 nm como referencia (doble longitud de onda).

Nota:

- 1) Asegúrese que el fondo de la placa esté limpio y seco y que no haya burbujas en el pocillo
 - 2) Mida el valor OD después de añadir la solución de parada tan pronto como sea posible (es recomendable leer los resultados a los diez minutos)
14. Cálculos:
- 1) Longitud de onda única (450 nm):
 $OD = OD_{450} - OD_{BC450}$
 OD: el valor OD calibrado
 OD_{450} : el valor OD original de los pocillos para muestras o controles
 OD_{BC450} : el valor OD del pocillo para el control en blanco
 - 2) Longitud de onda doble (450 nm/ 630 nm):
 $OD = OD_{450/630}$
 OD: el valor OD calibrado
 $OD_{450/630}$: el valor OD original de los pocillos para muestras o controles

PROCESADORES DE MICROPLACAS TOTALMENTE AUTOMATIZADOS

Hay disponibilidad de protocolos validados para una gama de instrumentos automatizados, contacte con su representante para más detalles. Para la instrumentación sin protocolos validados establecidos, se recomiendan las siguientes directrices:

1. Para la primera incubación se pueden programar los tiempos de incubación entre 55 y 65 minutos (ó 60 ± 5 minutos).
2. Para las incubaciones de 30 minutos se pueden programar los tiempos de incubación entre 28 y 32 minutos (ó 30 ± 2 minutos).

RESULTADOS

Los resultados de un ensayo son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

Una ejecución es válida si:

- 1) Sustrato en blanco:
El valor OD del control en blanco es menor que 0.100. (El pocillo para el control en blanco solo contiene cromógenos y solución de parada).
- 2) El valor OD del control negativo debe ser igual a o menor que (\leq) 0.100.
Eliminar cualquier control negativo con valor OD mayor que ($>$) 0.100.
Si los dos valores están fuera de este rango, la ejecución es inválida y el ensayo debe ser repetido.
- 3) El valor OD del control positivo debe ser igual a o mayor que (\geq) 0.500.
Si el valor OD es menor que 0.500, la ejecución es inválida y el ensayo debe ser repetido.

CALCULO DEL CONTROL

- 1) Valor de corte:
 Valor de corte: (C.O.) = $NCx * 2.1$
 NCx : el valor de absorbancia promedio para dos controles negativos.
 (si $NCx \leq 0.05$, NCx debe ser calculado como 0.05)

Ejemplo:

Absorbancia del control negativo: pocillo 1 = 0.013, pocillo 2 = 0.017
 $NCx = (0.013 + 0.017)/2 = 0.015$ (Para $NCx \leq 0.05$, NCx es calculado como 0.05)
 $NCx = 0.05$
 Valor de corte = $0.05 * 2.1 = 0.105$

- 2) Divida la absorbancia de la muestra entre el valor del corte
 Positivo: la absorbancia de la muestra es mayor que o igual que (\geq) el valor del corte.
 Negativo: la absorbancia de la muestra es menor que ($<$) el valor del corte.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Los especímenes que se encuentran reactivos por el procedimiento de selección deben ser re-examinados por duplicado. Los que resulten reactivos en al menos uno de los reensayos por duplicado son considerados repetidamente reactivos y deberían ser examinados con una prueba confirmatoria. Los especímenes que den resultados no reactivos deben considerarse negativos. Resultados reactivos falsos pueden ser causados por una de los siguientes problemas técnicos:

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

LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS

Aunque existe una estrecha asociación entre el HBsAg y el nivel de infectividad, en la actualidad los métodos disponibles no pueden detectar e identificar todas las muestras de sangre infectadas o casos de infección por VHB. También, la interpretación de un resultado reactivo no debe basarse únicamente en el resultado de la prueba de detección. Las muestras repetitivamente reactivas deben ser reexaminadas con una prueba de neutralización de confirmación para establecer la especificidad del resultado.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Sensibilidad Clínica y Especificidad

La sensibilidad clínica y la especificidad de este ensayo se determinaron por un panel de muestras obtenidas a partir de 2000 donantes de sangre sanos y 1500 pacientes hospitalizados no diagnosticados. En este estudio, la sensibilidad y la especificidad de este ensayo fueron de un 100%, 99,9%, respectivamente.

	Muestra	-	+	Positivo confirmado	Sensibilidad	Especificidad
Donantes	2000	1992	8	6	100%	99.9%
Pacientes	1500	1382	118	118	100%	100%

Sensibilidad Analítica

La sensibilidad del ensayo se ha calculado mediante las normas de referencia proporcionadas por los Institutos Nacionales para la Alimentación y para el Control de Drogas, China (NIFDC). El ensayo muestra la sensibilidad en el Corte de 0.1 IU / ml (adr), 0.1 IU / ml (adw) y 0.2 IU / ml (ay). Corte = 0.105.

	Muestra	OD
	0.1 IU/ml	0.106
Ay	0.2 IU/ml	0.157
	0.4 IU/ml	0.388
	0.05 IU/ml	0.112
Adw	0.1 IU/ml	0.201
	0.2 IU/ml	0.404
	0.05 IU/ml	0.110
Adr	0.1 IU/ml	0.193
	0-2 IU/ml	0.391

Especificidad Analítica

1. No se observó reactividad cruzada con muestras de pacientes infectados con el VHA, VHC, VIH y TP. No se observa interferencia de factores reumatoides hasta 2000U/ml, bilirrubina menos de 234 μ mol / L, y triglicéridos menos de 33.88 mmol /L.

2. No se observaron altas dosis del efecto gancho hasta concentraciones de HBsAg de 500.0001u / ml durante los ensayos clínicos.

BIBLIOGRAFIA

- Engvall E, and Perimann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem*, 8:871-874,1971
- 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.
- Kennedy RC, Loniscu-Matiu I, Alder-Alder-Storthz K, Henkel RD, Sanchez Y, Dreesman GR. Characterization of Anti-Hepatitis B Surface Antigen Monoclonal Antibodies, *Intervirolology*. 19: 176-180, 1983.
- 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 Viol. Meth.* 1: 257-273, 1980.
- Wands JR, Zurawski VR, High Affinity Monoclonal Antibodies to Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Produced by Somatic Cell Hybrids, *Gastroenterology* 80: 225-232, 1981.
- Technical Manual of the American Association of Blood Banks, Eighth Edition, Philadelphia,J.B., Lippincott Co., p. 216, 1981.
- Epidemiologic Notes and Reports, Hepatitis B Contamination in a Clinical Laboratory-Colorado, *MMWR* 29: 459-565, 1980.

InTec PRODUCTS, INC.

332 Xinguang Road, Xinyang Ind. Area,
Haicang, Xiamen, 361022, P.R. China
Tel: +86 592 6807188
Email: intecproducts@asinlec.com
www.intecasi.com