

Immunoensayo de la Enzima para la Determinación Cualitativa del Antígeno de Superficie de la Hepatitis B en Suero o Plasma Humano.

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de HBsAg

USO DESTINADO

Para la determinación cualitativa del antígeno de superficie de la Hepatitis B en suero o plasma humano.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por el virus de la Hepatitis B presentan serios problemas de salud pública en todo el mundo. La detección temprana de la infección es esencial. Hay una variedad de marcadores serológicos que monitorean la infección para HBV, y uno de los primeros de éstos es el HBsAg. El antígeno aparece antes de las evidencias bioquímicas de la enfermedad del hígado o de ictericia, persiste a través de la fase aguda de la enfermedad, y declina durante la convalecencia.

Los procedimientos para la detección del HBsAg incluyen desde los insensibles métodos de difusión de gel agarosa a las pruebas Microelisas para HBsAg. Con éste método, la sensibilidad obtenida en un panel de sueros de referencia ha sido equivalente al radioinmunoensayo. Subsecuentemente, los métodos de ELISA han tenido una aplicación muy amplia en la detección de antígenos y anticuerpos.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El producto ADVANCED HBsAg ELISA se basa en el immunoensayo "sándwich" de doble antígeno, el cual utiliza anticuerpos anti HBsAg específicos: anticuerpos monoclonales para HBsAg fijos en el fondo de los pocillos de las placas y anticuerpos policlonales para el HBsAg unidos a la peroxidasa de rábano picante (HRP) en la solución del conjugado. Durante el ensayo HBsAg existente en la muestra reaccionara con estos anticuerpos para formar un complejo inmune de "anticuerpo-Anti-HBsAg-anticuerpo-HRP". Posteriormente el material que no reacciona será eliminado durante el proceso de lavado y el sustrato agregado determina el resultado de la prueba. La presencia de un color azul en los pocillos de la placa indica que un resultado es reactivo para el HBsAg. La ausencia de color indica resultados no reactivos en la muestra.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Placa de pocillos recubiertos con anticuerpos.
2. Coniugado concentrado (20x)
3. Control Positivo
4. Control Negativo
5. Diluyente del Coniugado
6. Color A (Solución H₂O₂)
7. Color B (Sustrato de TMB)

8. Solución de Paro (ácido sulfúrico 2M)
9. Buffer de lavado concentrado (20x)
10. Sellador de Placa
11. Bolsa de Plástico

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas para volúmenes de 1-1000 µL
2. Puntas para pipetas
3. Incubador de 37°C
4. Agua desionizada o destilada
5. Lavador de placas de pruebas Microelisa.
6. Lectores de placas o de tiras con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 615-690 nm

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

1. **ESTE PRODUCTO ES SOLAMENTE PARA EL DIAGNOSTICO IN VITRO.**
2. Médicos o personal técnico de laboratorio solamente deberán de manejar éste producto.
3. Agitar cada reactivo suavemente antes de utilizarlo.
4. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad.
5. Componentes Individuales o cantidades residuales no deben usarse en combinación con otros productos de lotes diferentes.
6. Evitar la contaminación microbiana de reactivos.
7. Evitar la exposición de la solución de TMB a luz intensa, metales, u oxidantes.

INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

1. Material biológico potencialmente infeccioso: este producto contiene componentes de sangre humana y se debe manejar como un agente infeccioso. Los ensayos no ofrecen una completa seguridad que los productos derivados de fuentes humana no transmitirán la infección. Por lo que todos los derivados de sangre deben considerarse potencialmente infecciosos, asimismo se recomienda que éstos reactivos y muestras de origen humano se manejen de acuerdo a las buenas prácticas de trabajo del laboratorio. El control positivo fue inactivado por calentamiento.
2. No fumar o comer en áreas donde las muestras o los productos se estén manejando.
3. No pipetear con la boca. Utilizar guantes de plástico desechables cuando se manejan reactivos o muestras y lavarse las manos con hipoclorito de sodio al 5%
4. Las muestras infecciosas y los derramamientos no ácidos deben limpiarse con hipoclorito de sodio al 5 %
5. Todos los materiales desechados deben desinfectarse adecuadamente antes de tirarlos. Tanto los desperdicios líquidos como sólidos deberán de meterse a la autoclave a 121 °C al menos por una hora. Los desechos sólidos también pueden incinerarse, los desechos, líquidos no ácidos también pueden diluirse a una concentración final del 1.0 %. Los desperdicios líquidos requieren neutralizarse antes y dejarse por 30 minutos para obtener una desinfección completa.
6. Evitar el contacto de la piel y mucosas con ácido sulfúrico. Si llegara a ocurrir, lavar inmediatamente con agua.



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

1. Obtener muestras de suero o plasma por los procedimientos regulares del laboratorio clínico. Separar el suero del coagulo o el plasma de la sangre tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
2. Las muestras que contienen azida de sodio o materiales particulados pueden dar resultados erróneos.
3. Las muestras se deben refrigerar si no se utilizan dentro de los 3 días posteriores de la recolección. Las muestras congeladas se deben descongelar y mezclarse antes de ensayarlas. Evitar congelar y descongelar las muestras por más de 2-3 veces antes de usarse.

CONSERVACION DEL REACTIVO

1. El producto debe ser conservado de 2- 8 °C. Utilizar los reactivos tan pronto como sea posible después que fueron abiertos.
2. Regrese los reactivos inmediatamente después de utilizarlos.
3. Si la placa no se usa completamente, tape los pocillos que no se utilizaron con el sellador de placa, métalos a la bolsa de plástico con el desecador y consérvelos de 2-8 °C.
4. Revise el buffer de lavado concentrado para observar si hay sales cristalizadas. Si los cristales se han precipitado antes de su uso, caliente la solución de 37- 40 °C en baño maría hasta su completa disolución.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. SOLUCIÓN DEL TRABAJO DEL CONJUGADO

- A) Diluir el conjugado al volumen requerido con el diluyente de conjugado de acuerdo a la siguiente tabla:
- B) La solución de trabajo del conjugado se deberá de conservar de 2-8 °C por 4 semanas.

Tabla de dilución del conjugado:

Número de pruebas	16	32	48	64	80	96
Diluyente del conjugado (mL)	1	2	3	4	5	6
Conjugado concentrado (µL)	50	100	150	200	250	300

2. BUFFER DE LAVADO

- A) Diluir 1 volumen del buffer de lavado concentrado con 19 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
- B) El buffer de lavado se puede conservar a temperatura ambiente durante una semana.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (18-25 °C) antes de iniciar la prueba. Mezclar antes de usarlos. Ajustar el incubadora 37±1 °C.
2. Anotar en una hoja de reportes los números de muestras, controles y pocillos que se utilizarán. Un pocillo para el blanco, cinco pocillos adicionales para los controles y uno para cada muestra. **NOTA:** *Cubra los pocillos sin usar con el sellador de la placa e introdúzcalos a la bolsa de plástico junto con el desecador y consérvelos de 2-8 °C.*
3. Adicione 50 µL de control (3 controles negativos y 2 controles positivos) y 50 µL de cada muestra en los pocillos seleccionados de acuerdo con la hoja de reportes. (Reservar un pocillo para el blanco).
4. Adicionar 50 µL de la solución de trabajo del conjugado a cada pocillo de reacción excepto para el blanco. **NOTA:** *No toque los bordes de los pocillos para evitar falsos resultados.*
5. Con cuidado cubra la placa y mezcle los líquidos que están en los pocillos; no derrame líquidos en los contenedores.
6. Incube la placa por 60 minutos en incubador de 37°C.
7. Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado de acuerdo al

procedimiento de lavado: **A)** *Los lavados deberán de hacerse estrictamente de acuerdo a las instrucciones, lavados incompletos pueden originar falsos resultados.* **B)** *Aspirar completamente el contenido de los pocillos en un recipiente de desechos. Después llene los pocillos con buffer de lavado (350 µL o más), evite que se derramen.* **C)** *Dejar remojando (aprox. 30-60 segundos). Aspirar completamente y repetir los lavados de acuerdo al método por cuatro veces más, para un total de 5 lavados.* **D)** *Estar seguro que no queden líquidos remanentes en las tiras y los contenedores de las tiras después de la última aspiración. (por ej. usar papel absorbente).* **NOTA.** *Lavados incorrectos pueden ocasionar falsos resultados.*

8. Adicionar 50 µL de color A y 50 µL de color B a cada pocillo.
9. Incubar la placa por 15 minutos en el incubador de 37 °C.
10. Adicionar 50 µL de ácido sulfúrico 2M a cada pocillo, cubrir la placa.
11. Leer la DO en lector de micropocillos a 450 nm (filtro sencillo) o a 450 nm y a 630 nm como referencia (doble filtro).

CONTROL DE CALIDAD

Los resultados del ensayo son válidos si cumplen los siguientes criterios:

1. **Blanco de Sustrato:** El valor de la absorbancia debe ser menor que o igual (\leq) 0.100
2. La Absorbancia de los controles negativos después de restarles el blanco. (CN)
Cada CN debe ser menor que o igual (\leq) 0.100
Eliminar cualquier CN más grande que ($>$) 0.100
Si dos de los valores están fuera del rango, la corrida se invalidará y el ensayo deberá de repetirse.
3. La absorbancia de los controles positivos después de quitar la del blanco.(CP)
El promedio de los CP debe ser más grande que o igual(\geq) 0.500
Si el valor es más bajo, la corrida se invalidará y el ensayo se deberá repetir.

CALCULOS Y RESULTADOS

1. La absorbancia promedio de los Controles Negativos(CNx):
 $CNx = (CN1+CN2+CN3)/3$
Eliminar cualquier CN más grande que($>$) 0.100
2. Valor del corte:
Valor de corte= 0.100+NCx

3. Dividir la absorbancia de la muestra entre el valor del corte.

POSITIVO: la absorbancia de la muestra es más grande que o igual (\geq) al valor de corte.

NEGATIVO: la absorbancia de la muestra es menor que ($<$) valor del corte

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Repetir las pruebas por duplicado de las muestras que se encontraron reactivas por el método de escrutinio para verificar si es reactiva repetidamente. Si ninguna de las repeticiones es reactiva, la muestra se deberá considerar negativa. Si la muestra es reactiva en cualquiera de las repeticiones, la muestra se deberá considerar capaz de ser repetidamente positiva por lo que se deberá analizar con una prueba confirmatoria

Los resultados falsos reactivos pueden ser causados por uno de los siguientes problemas técnicos:

1. Por arrastre de muestras muy reactivas debidas a la contaminación con el equipo o por puntas de las pipetas.
2. Contaminación del sustrato con iones de metales.
3. Contaminación cruzada.
4. Lavados o aspiraciones inadecuadas durante el proceso del lavado.

5. Fallas para quitar el exceso de humedad del fondo de los pocillos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A pesar que hay una asociación estrecha entre el HBsAg y el nivel de infectividad, comúnmente métodos disponibles no pueden detectar e identificar muestras de sangre infectadas o casos de infección por el HBV. También la interpretación de un resultado reactivo no puede basarse solamente en el resultado de la prueba de escrutinio. Las muestras reactivas repetidamente deben de confirmarse por una prueba de neutralización para establecer la especificidad de los resultados.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

Los siguientes resultados se obtuvieron de evaluaciones analíticas de sensibilidad del producto ADVANCED HBsAg ELISA.

Concentración en	ng/mL
HBsAg adr	0.5
HBsAg adw	0.5
HBsAg ay	0.5

ESPECIFICIDAD

La especificidad del producto ADVANCED HBsAg ELISA se determinó en un laboratorio independiente con 4259 muestras de suero de donadores de sangre sanos, 4 muestras fueron reactivas (99.9 %).

En éste estudio la especificidad que se obtuvo fue del 99.9 %.

REFERENCIAS

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) (in) *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, Zimmerman DH, and Bond HE, Solid-Phase Enzyme immunoassay for 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, Courouce A-M, Kalil J, Ropars C, Fellous M, Monoclonal antibodies to HBsAg produced by murine hybridomas. (in) *Viral Hepatitis (Szmunes, 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, Tomas 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, *Inter-virology.* 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. Viol. 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. U.S. 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. Schulster 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, 1969.*
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.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTEC PRODUCTS INC

332 XINGUAN ROAD, XINYANG INDUSTRY

AREA, HAICANG XIAMEN, 361022,

R.P. CHINA