

ANTI-HBc

EIA WELL

REF: KHB2EW
96 TESTES
KHB2EWB
192 TESTES

 **RADIM**
Latino América

REAGENTES DO KIT

REAGENTES	QUANTIDADE		ESTADO FÍSICO
MTP - Microcavidades	1X96	2X96	Pronto para uso
WASH-Solução de lavagem	1x50ml	2x50ml	Concentrado
Conjugado	1X14ml	2X14ml	Pronto para uso
Controle Negativo	1x2,5ml	1x2,5ml	Pronto para uso
Controle Positivo	1X1,5ml	1X1,5ml	Pronto para uso
Cromógeno	1x15 ml	1x15ml	Líquido
Tampão substrato	1x15 ml	1x15ml	Líquido
Solução STOP	1x14 ml	2x14 ml	Pronto para uso

As instruções de uso traduzidas em outros idiomas de interesse podem ser consultadas no site da Internet www.radim.com

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS CONTRA O ANTÍGENO “CORE” DO VÍRUS DE HEPATITE B (ANTI-HBc) EM PLASMA OU SORO HUMANO

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

1. APLICAÇÃO CLÍNICA

O teste para anticorpos contra o antígeno “core” da Hepatite B (anti-HBc), em soro ou plasma humano é um importante recurso diagnóstico na monitoração da infecção causada pelo vírus da Hepatite B. Geralmente os anticorpos anti-HBc surgem no soro logo após a soroconversão do HBsAg, e persiste até que os anticorpos anti-HBs se tornem detectáveis. Portanto, se os dois marcadores HBsAg e anti-HBs estiverem ausentes, os anticorpos anti-HBc podem indicar uma infecção recente ou um sangue potencialmente infectante. As duas classes de anticorpos IgG e IgM são encontradas no soro do paciente infectado. Os anticorpos IgM são os primeiros a surgirem, alcançando seu pico durante a fase aguda, enquanto os anticorpos IgG podem persistir durante anos sem sinais de infecção.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Este teste baseia-se no método imunoenzimático competitivo (EIA). Durante a primeira incubação, a amostra contendo anticorpos Anti-HBc competem com o anticorpo monoclonal anti-HBc conjugado com peroxidase de rábano (HRPO) para os sítios específicos das microcavidades revestidas com HBcAg recombinante. Ao final da incubação, o material que não se ligou é removido por aspiração e lavagem. A atividade da enzima que está ligada na fase sólida é inversamente proporcional à concentração de anti-HBc presente nos controles e nas amostras, e isto é demonstrado pela incubação das microcavidades com a solução cromógeno (Tetrametilbenzidina, TMB) e um Tampão Substrato. A leitura colorimétrica será realizada com o uso de um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450nm e 405 nm.

3. REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT

- Os reagentes são suficientes para os 96 testes ou para 192 testes
- Estocar o kit entre 2° a 8°C.
- A data de validade de cada reagente está registrada nas etiquetas de cada frasco.
- Uma vez aberto o kit é estável entre 2°C a 8°C durante dois meses

3.1 Reagentes específicos

MTP **Microplaca sensibilizada** – 1 ou 2 microcavidades de 96 poços – microcavidades autoquebráveis, revestidas com HBcAg (DNA recombinante). Manter microcavidades não utilizadas entre 2º e 8°C, na embalagem plástica fornecida devidamente selada.

NEG **Controle negativo:** Matriz sérica negativo para HbsAg, anti-HIV e anti-HCV. Pronto para uso. Conservante: Neomicina e Mertiolato (<0,05%).

POS **Controle positivo:** Matriz sérica, negativo para HbsAg, anti-HIV e anti-HCV. Contém IgG anti-HBc. Pronto para uso. Conservante: Neomicina e Mertiolato (<0,05%).

CONJ **Conjugado enzimático:** IgG monoclonal anti-HBc conjugado com peroxidase de rábano (HRPO), em TRIS-HCl com BSA (albumina bovina sérica) e estabilizantes. Pronto para uso. Conservante: Neomicina.

3.2 Reagentes comuns para os kits da linha Hepatite B

WASH **Solução de lavagem (concentrada)** - PBS e Tween 20. Conservante: Mertiolato (<0,05%). Dilua o frasco em 500ml de água destilada. Armazenar a solução diluída entre 2ºc e 8°C por 30 dias. Na presença de cristais insolúveis, resuspender a solução colocando o frasco a 37°C por alguns minutos.

TMB **Cromógeno:** Tetrametilbenzidina em tampão citrato-fosfato e DMSO. Líquido.

SUBS **Tampão substrato:** Tampão citrato fosfato e H₂O₂. Líquido

NOTA: Para obter a Solução Substrato, misturar volumes iguais de Cromógeno com Tampão substrato em um frasco escuro e totalmente limpo. Evitar a exposição de luz e usar em no máximo 1 hora.

STOP **Reagente bloqueador:** H₂SO₄ 1N. Pronto para uso.

CPA **Adesivo para selagem das microplacas**

Saco plástico

4. MATERIAL NECESSÁRIO E NÃO FORNECIDO

4.1 Teste Manual

- Micropipetas automáticas, ajustável, com ponteiros descartáveis.
- Incubador ajustável em 37°C.
- Provetas graduadas para a diluição de reagentes
- Bomba de aspiração ou lavadora de microplacas automatizada.

- Espectrofotômetro para microplacas capaz de medir a absorvâncias entre 0-3,0 A dentro de um intervalo de 450 nm a 405 nm.
- Água destilada

4.2 Teste automático

Este teste pode ser utilizado em equipamentos automáticos para kits ELISA em microplacas.

Nós garantimos sua aplicação nos equipamentos automáticos da RADIM e/ou SEAC.

Ao utilizar um equipamento automático que não seja da marca RADIM ou SEAC, é de responsabilidade do usuário final certificar-se que o equipamento foi apropriadamente testado para os kits por ELISA.

5. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para obter resultados reproduzíveis, as seguintes regras devem ser observadas:

- Não misturar reagentes de lotes diferentes (ver item 3.1).
- É possível misturar reagentes comuns (ver 3.2) de lotes diferentes.
- Não usar reagentes próximos de sua data de validade.
- Não estocar ou deixar reagentes e amostras em temperaturas altas ou áreas de possível contaminação.
- Usar vidraria totalmente limpo, isenta de contaminação por íons metálicos ou substâncias oxidantes.
- Use água destilada ou deionizada, estocada em frascos totalmente limpos.
- Cuidadosamente, evitar qualquer contaminação entre as amostras; para esta finalidade, devem ser utilizadas ponteiras descartáveis para cada amostra e cada reagente.
- Não modificar de maneira alguma o “Procedimento do Ensaio”. Se v. não respeitar
 - os tempos exatos de incubação e quantidades adicionadas de reagentes
 - tempos e temperaturas de incubação

Podem ocorrer resultados clínicos incorretos.

- Reconstituir os reagentes liofilizados, se presentes no kit, como descrito nos respectivos rótulos. Qualquer desvio no uso do reagente ou volumes errados pode afetar a confiabilidade dos resultados obtidos.
- No caso de procedimento manual, é importante utilizar pipetas calibradas e possuir uma técnica manual apropriada. É de primordial importância uma boa precisão na preparação e distribuição dos reagentes. Certificar-se que todos os equipamentos utilizados estejam em perfeita ordem, estejam corretamente calibrados e regularmente submetidos à manutenção.

- Certificar-se que a bomba de aspiração ou o dispositivo de lavagem automática está em perfeita ordem. Uma rinsagem inadequada das microcavidades pode causar uma classificação incorreta das amostras. Certificar-se que todos os equipamentos utilizados estejam em perfeita ordem.
- Certificar-se que o espectrofotômetro para a leitura das microplacas esteja em perfeita ordem. O uso de um espectrofotômetro não calibrado ou com filtros sujos pode causar uma leitura incorreta das amostras com uma conseqüente classificação incorreta das mesmas. Certificar-se que todos os equipamentos utilizados estejam em perfeita ordem.
- Certificar-se que a incubadora (quando necessário) esteja em perfeita ordem. Uma temperatura de incubação diferente de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pode causar perda de sensibilidade e/ou desnaturação biológica (amostras e/ou reagentes). Certificar-se que o equipamento utilizado esteja em perfeita ordem e eu seja periodicamente verificado em relação às temperaturas registradas.
- Certificar-se que o agitador de microplacas (quando necessário) esteja em perfeita ordem. Uma agitação incorreta pode causar uma classificação errada de amostras. Certificar-se que o equipamento utilizado esteja em perfeita ordem.
- Certificar-se que todos os equipamentos utilizados para a estocagem de amostras e/ou o sistema esteja em perfeita ordem. A estocagem em temperaturas diferentes das sugeridas pode causar uma denaturação biológica do material (amostras e/ou reagentes). Certificar-se que os equipamentos utilizados estejam em perfeita ordem e que sejam periodicamente verificados em relação à temperatura registrada.
- Utilizar um método apropriado para a identificação correta das amostras de pacientes. Uma identificação incorreta pode causar perda de especificidade do sistema e resultados clínicos errôneos.

Para evitar contaminação pessoal e ambiental, as seguintes precauções devem ser observadas:

- Utilizar luvas descartáveis ao manipular material potencialmente infectante e enquanto estiver realizando o teste.
- Não pipetar reagentes com a boca.
- Não fumar, beber, comer ou aplicar cosméticos durante a realização do teste.
- O Cromógeno e o Reagente Bloqueador devem ser manipulados com cuidado. Evitar o contato com a pele, olhos e membranas mucosas. Em caso de acidentes enxaguar muito bem com água corrente.
- Todos os materiais de origem humana utilizados para a preparação deste kit apresentaram resultados negativos para HBcAg, anti-HIV e anti-HCV. Considerando-se que nenhum teste atualmente pode garantir a completa ausência destes vírus, todas as amostras e reagentes

contendo material biológico utilizados para o teste devem ser considerados potencialmente infectantes.

- Evitar respingos e formação de aerossóis; nestes casos, lavar cuidadosamente com solução de hipoclorito de sódio a 3%. Qualquer material de limpeza deve ser tratado como potencialmente infectantes e descartado de acordo.
- De acordo com a legislação italiana D.L. nr. 22 datada de 05/02/97, em conformidade com as Diretrizes da Comunidade Européia (91/156/EEC, 91/689/EEC, 94/62/EEC), todos os produtos para descarte formados tanto pelo procedimento manual e/ou procedimento automatizado são considerados como material de descarte especial (Classificação Européia código 180103). Desta forma, devem ser eliminados por empresas especializadas, qualificados para a coleta e descarte de dejetos.

6. COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O teste pode ser realizado de amostras de soro ou plasma. Amostras altamente lipêmicas ou hemolisadas devem ser descartadas. Manter as amostras devidamente armazenadas entre 2°C a 8°C durante 7 dias; para períodos mais longos, recomenda-se congelar as amostras a -20°C. As amostras de plasma podem apresentar filamentos de fibrina que podem interferir no ensaio; assegurar-se de que as amostras estejam sempre perfeitamente límpidas antes do uso. Devem ser evitados congelamentos e descongelamentos repetidos.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO*

- Deixar que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente.
- Misturar amostras por inversão antes do uso.

7.1 Preparar as microcavidades para o ensaio. Incluir quatro replicatas de controle negativo, duplicatas para “blanks” assim como para o controle positivo.

7.2 Pipetar **100 µL** de controle negativo, controle positivo e amostras dentro das respectivas microcavidades.

7.3 Cobrir a microplaca com o adesivo para selagem e homogeneizar delicadamente.

7.4 Incubar as microcavidades por **60 ± 5 minutos a 37°C ± 2 minutos**.

7.5 Remover o adesivo para selagem e aspirar cuidadosamente à mistura incubada de todas as microcavidades.

7.6 Lavar as microcavidades **4 vezes** com **350 µL** de solução para lavagem. Aspirar todos os líquidos das microcavidades.

7.7 Pipetar **100 µL** de conjugado enzimático em todas as microcavidades.

7.8 Cobrir a microplaca com o adesivo para selagem e homogeneizar delicadamente.

7.9 Incubar por **30 ± 5 minutos a 37°C ± 2°C**.

7.10 Remover o adesivo para selagem e aspirar cuidadosamente a mistura incubada de todas as microcavidades.

7.11 Lavar as microcavidades conforme descrito no item 7.6

7.12 Pipetar **100 µL** de solução de substrato cromógeno (ver parágrafo do reagente) dentro das microcavidades.

7.13 Incubar por **20 ± 2 minutos a 37°C ± 2°C**, evitando a exposição direta de luz.

7.14 Pipetar **100 µL** de reagente bloqueador dentro das microcavidades.

7.15 Ler a absorbância das microcavidades, com um espectrofotômetro bicromático a 450 nm, com comprimento de onda de referência a 620 nm (ajustar o equipamento no zero com a microcavidade "blank"). As leituras devem ser completadas no espaço de tempo de 15 minutos após o término do teste.

* Ao utilizar no procedimento um equipamento RADIM e/ou SEAC, consultar o respectivo Manual do Usuário.

8. ESQUEMA DE ENSAIO

Ver ao final das instruções de uso.

9. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Quando for utilizado um equipamento RADIM e/ou SEAC, a leitura do espectrofotômetro será realizada automaticamente em 3 diferentes comprimentos de onda: 450, 620 e 405nm permitindo assim uma faixa de curva maior.

Absorbância Média do Controle Negativo: Calcular a absorbância média dos controles negativos excluindo os valores fora da faixa de 0,8 -1,2 vezes do valor médio. Caso um valor ficar fora desta faixa, deve ser eliminado e a média recalculada.

Absorbância Média do Controle Positivo: Calcular a absorbância média dos controles positivos. A Média Controle Negativo – Média Controle Positivo deve ser maior que 0,800. Caso contrário, o ensaio deve ser considerado inválido.

Valor “cut-off”: Média da absorbância dos controles negativos X 0,2.

A absorbância do “blank” a 450 nm deve ser <0.150.
--

9.1 EXEMPLO DE CÁLCULO

Os valores a seguir devem ser considerados apenas como um exemplo e **não devem** ser utilizados ao invés dos dados experimentais.

Controles Negativos: $(2.070 + 2.105 + 2.120 + 2.205) : 4 = 2.125$ (Média do Controle Negativo)

Controles Positivos: $(0,168 + 0,180) : 2 = 0,174$ (Média do Controle Positivo)

$(2.125 - 0,174) = 1.951$ ($>0,800$)

O teste deve ser considerado válido.

Valor “cut-off”: $(2.125 \times 0,2) = 0,425$

9.2 INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

As amostras com uma absorbância menor que o valor de “cut-off” devem ser consideradas reativas para o anti-HBc. As amostras com uma absorbância maior que o valor “cut-off” devem ser consideradas não reativas para anti-HBc. As amostras não reativas no primeiro ensaio (absorbância maior que o valor “cut-off”) devem ser consideradas negativas para o anti-HBc. As amostras reativas no primeiro ensaio (absorbância menor que o valor “cut-off”) devem ser retestadas para confirmação. Caso a amostra não seja repetidamente reativa, deve ser considerado negativa para o anti-HBc. Amostras reativas repetidamente devem ser consideradas positivas para anti-HBc. As amostras com uma absorbância com taxa de “cut-off” $\pm 10\%$ (zona cinzenta) deve ser considerada questionável e ser retestada.

- Absorbância menor que o valor “cut-off”: amostras positivas anti-HBc.
- Absorbância maior ou igual ao valor “cut-off”: amostras negativas anti-HBc.
- Absorbância com taxa de $\pm 10\%$ de “cut-off” (zona cinza): amostras questionáveis para anti-HBc.

10. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

10.1 Especificidade diagnóstica

A especificidade diagnóstica do método foi avaliada em um grupo de 5.000 amostras (doadores de sangue e pacientes negativos hospitalizados), com um resultado de 99,86%.

10.2 Sensibilidade diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada em grupo de 400 amostras positivas, com um resultado de 100%.

10.3 Especificidade analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a habilidade do teste em detectar precisamente analito específico na presença de fatores potencialmente interferentes presentes na amostra. Estudos controlados de substâncias potencialmente interferentes demonstraram que o desempenho do teste não foi afetado por anticoagulantes (EDTA e heparina) ou pela presença de auto-anticorpos ou viroses correlacionadas. Estudos adicionais em soros de gestantes demonstraram que o desempenho do ensaio não foi afetado por nenhum tipo de substâncias interferentes.

10.4 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do método foi avaliada testando-se uma diluição seriada de padrões anti-HBc fornecidos pelo Instituto Paul Ehrlich (Alemanha). Estes valores padronizados são expressos em UI/ml.

Anti-HBc	Absorbância
2,5 UI/ml	0,120
1,25 UI/ml	0,121
0,625UI/ml	0,302
0,312 UI/ml	0,685
Controle Negativo Médio	1,899
Controle Positivo Médio	0,166
Valor "cut-off"	0,379

A concentração mínima de anti-HBc detectada é de 0,45 UI/ml.

10.5 Precisão

A precisão foi avaliada em um equipamento RADIM ou SEAC determinando a repetibilidade e a reprodutibilidade do teste (variabilidade intra e inter-ensaios) em três soros com concentrações diferentes de anti-HBc. Para transformar o resultado qualitativo em parâmetro quantitativo, as densidades ópticas para o soro foram divididas pelo valor do "cut-off", obtendo então um relação sinal/"cut-off" (S/CO)

Repetibilidade (Intra-ensaio)

Soro	Média	± (S/CO)	S.D.	C.V. %	Replicatas no.
A	0,07	±	0,02	31,5	10
B	0,94	±	0,05	5,7	10
C	3,97	±	0,13	3,4	10

Reprodutibilidade (Inter-ensaio)

Soro	Médias	± (S/CO)	S.D.	C.V. %	Replicatas no.
A	0,3	±	0	11,6	10
B	1,4	±	0,1	8,6	10
C	3,3	±	0,3	9,6	10

11. LIMITES DO ENSAIO

Os resultados do teste devem ser cuidadosamente interpretados e confirmados por avaliações clínicas e testes diagnósticos posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Almeida, D. Rubenstein, E.F. Stott. New antigen-antibody system in Australia antigen positive hepatitis. *Lancet*, ii: 1225 (1971).
- 2 - Hoofnagle J.H., Gerety R.J. and Barker L.F. Antibody to Hepatitis-B-Virus Core in Man. *Lancet*, ii: 869-873, 1973.
- 3 - Hoofnagle J.H., Seeff L.B., Bales Z.B., Gerety R.J. and Tabor E. Serologic Responses in HB. *Viral Hepatitis* (Vyas, G.N., Cohen S.N. and Schmid R., eds) The Franklin Institute Press, 1978, pp. 219-242.
- 4 - Krugman et al. DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen. *New Engl. J. Med.*, 290: 1331 (1974).
- 5 - Krugman S., Overby L.R., Mushahwar I.K., Ling C.M., Frösner G.G. and Deinhardt F. *Viral Hepatitis, Type B: Studies on natural History and Prevention Re-examined*, *N. Eng. J. Med.*, 300: 101-106, 1979.
- 6 - Szmuness et al. Antibody against the hepatitis type B core antigen. A new tool for epidemiologic studies. *Am. J. Epidem.*, 104: 256 (1976).
- 7 - Lander J.J., Gitnick G.L., Gelb L.H. and Aach R.D. Anticore Antibody Screening of Transfused Blood. *Vox. Sang.*, 34: 77-80, 1978.

ESQUEMA DE ENSAIO

Microcavidades	“blank”	Controle Negativo	Controle Positivo	Amostras
Controle negativo	-----	100 µl	-----	-----
Controle Positivo	-----	-----	100 µl	-----
Amostras	-----	-----	-----	100 µl

- Incubação: 37 °C ± 2C, 60' ± 5'
- Aspirar e lavar: 4 x 350 µl

Conjugado	-----	100 µl	100 µl	100 µl
-----------	-------	--------	--------	--------

- Incubação: 37 °C ± 2C, 30' ± 2'.
- Aspirar e lavar 4 x 350 µL

Cromógeno/Substrato	100µl	100 µl	100 µl	100 µl
---------------------	-------	--------	--------	--------










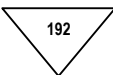



- Incubação: 37 °C ± 2C, 20' ± 2'.

Reagente bloqueador	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
---------------------	--------	--------	--------	--------

- Leitura: 450 - 405 nm.

SÍMBOLOS

EN 980 - EDMA

REF	Referencia ou número do pedido
	Lote
	Data de vencimento
	Para uso diagnóstico In-vitro
	Marcação CE segundo a diretiva IVD 98/79 CE
	Conservar entre 2 e 8°C
	Fabricante
	Risco biológico
	Consultar as instruções de uso
	Suficiente para 96 testes
	Suficiente para 192 testes
	Data de referência
	Reconstituir com
	Água destilada ou deionizada

Fabricado por:

RADIM SPA
Via del Mare, 125
00040 - Pomezia
ITÁLIA

Importado e distribuído por:

RADIM LATINO AMÉRICA DIAGNÓSTICOS LTDA.
Rua Domingos de Morais, 1061 cj 111 e 112 – Vila Mariana
CEP.04009-002 – São Paulo - SP
BRASIL
CNPJ. 04.595.434/0001-32

Serviço de Atendimento ao Consumidor:

Fone - 11-5084-9669 Fax: 11-5082-2029

POTENCIALMENTE INFECTANTE

Uso exclusivo ara diagnóstico in vitro

Reg. ANVISA: 80103990082

Conservar entre 2°C - 8°C

Resp. Técnico - Sueli Sayori Nakano / CRBM 4501