

ANTI-HBc IgM

IEMA WELL

REF: KHB2IM
96 TESTES

 **RADIM**
Latino América

REAGENTES DO KIT

	Reagentes		ESTADO FÍSICO
MTP	Microplaca	1 X 96	Pronto para uso
WASH	Solução de lavagem	1 x 50 ml	Concentrado
DIL	Diluyente de amostras	1 x 100 ml	Pronto para uso
NEG	Controle Negativo	1 x 1,0ml	Pronto para uso
POS	Controle Positivo	1 x 1 ml	Pronto para uso
AG	Antígeno HBc Ag	1 x 14 ml	Pronto para uso
CONJ	Conjugado enzimático	1 x 14 ml	Pronto para uso
TMB	Cromógeno	1 x 15 ml	Líquido
SUBS	Tampão substrato	1 x 15 ml	Líquido
STOP	Reagente bloqueador	1 x 14 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 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS IgM CONTRA O ANTÍGENO “CORE” DO VÍRUS DA HEPATITE B (Anti-HBc IgM) EM PLASMA OU SORO HUMANO

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

1. APLICAÇÃO CLÍNICA

O teste de anticorpos contra o antígeno “core” do vírus da hepatite B (Anti-HBc) é um recurso no monitoramento da infecção da hepatite B. Os anticorpos anti-HBc aparecem no soro pouco tempo depois da soroconversão do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e persistem até o seu desaparecimento, antes que os anticorpos anti-HBs se tornem detectáveis. A presença de anticorpos da classe IgM anti-HBc durante os primeiros estágios da doença, indicam uma resposta primária à infecção HBV no paciente. Este marcador (anti-HBc IgM), portanto, é a melhor ferramenta para detectar indivíduos assim denominado “período da janela” da infecção da hepatite B,

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Este ensaio imunoenzimométrico (IEMA) baseia-se na captura dos anticorpos anti-HBc IgM na amostra através de um anticorpo monoclonal específico IgM anti-humano na fase sólida. Durante a segunda incubação um antígeno (HbcAg) obtido através do DNA recombinante e um anticorpo monoclonal anti-HbcAg conjugado com peroxidase de rábano (HRPO) reagem com o IgM capturado, se presente, formando então um complexo denominado de “sanduíche”. A atividade enzimática encontrada nas microcavidades, que é diretamente proporcional à concentração de anti-HBc IgM encontrada na amostra, será evidenciada pela adição de uma solução Cromógeno (Tetrametilbenzidina, TMB) em um Tampão Substrato às microcavidades. A leitura colorimétrica será realizada com o uso de um espectrofotômetro regulado a um comprimento de onda de 450nm e 405 nm.

3. REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT

- Os reagentes são suficientes para os 96 testes.
- Estocar o kit entre 2º 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 revestida – 96 microcavidades** – microcavidades autoquebráveis, revestidas com anticorpos monoclonais anti-IgM humana. Manter as microcavidades não utilizadas entre 2º e 8°C, na embalagem plástica fornecida devidamente selada.

NEG **Controle negativo – 1 x 1ml** - Matriz sérica negativo para HbsAg, anti-HIV e anti-HCV. Conservante: NaN₃ (<0,1%). Pronto para uso.

POS **Controle positivo – 1 x 1 ml** - Matriz sérica, positiva para HbsAg e anti-HBcl gM, negativo para anti-HIV e anti-HCV. Conservante: NaN₃ (<0,1%). Pronto para uso.

Ag **Antígeno (HbcAg) – 1 x 14 ml** - DNA recombinante de HbcAg em tampão Tris-HCl, BSA e estabilizantes. Conservante: Neomicina (<0,05%). Pronto para uso.

CONJ **Conjugado enzimático – 1 x 14 ml** - Anticorpo monoclonal anti-HBc conjugado com peroxidase de rábano (HRPO), em Tris-HCl, BSA e estabilizantes. Preservativo: Neomicina. Pronto para uso.

DIL. **Diluyente de Amostra – 1 x 100 ml** - Solução protéica. Conservante: NaN₃ (<0,1%). Pronto para uso.

3.2 Reagentes comuns para os kits da linha Hepatite B

WASH **Solução de lavagem (concentrada) – 1 x 50 ml** PBS, Tween 20. Conservante: Mertiolato (0,05%). Dilua o frasco em 500ml de água destilada. Na presença de cristais insolúveis, ressuspender a solução colocando o frasco à 37°C por alguns minutos. Armazenar a solução diluída entre 2°C e 8°C por 30 dias.

TMB **Cromógeno – 1 x 15 ml** - Tetrametilbenzidina (TMB) com tampão citrato fosfato e DMSO. Líquido.

SUBS **Tampão substrato – 1 x 15 ml** - 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 – 1 x 14 ml** - 1N H₂SO₄. 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Provetas graduadas para a diluição de reagentes
- Bomba de aspiração ou lavadora de microplacas automatizada.
- Espectrofotômetro para microplacas capaz de medir a absorbâncias 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 com 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 este finalidade, devem ser utilizadas ponteiros 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 incubaçãoPodem 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 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 bioperigosos (Classificação Européia código 180103). Desta forma, devem ser eliminados por empresas especializadas, qualificados para a coleta e descarte de dejetos.

6. COLETA E PREPARAÇÃO DE 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.

Antes do uso, diluir as amostras 1:51 com a Solução Diluente de Amostra (ex: 10 µl amostra + 500 µl de Diluente de Amostra). Agitar no vórtex.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO*

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

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

7.2 Pipetar **10µL** de controle negativo, controle positivo e amostras diluídas dentro das respectivas microcavidades. Adicionar **200µL** de Diluente de amostra em todas as microcavidades, exceto para o poço Blank.

OBS. Não diluir o soro controle

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 **350µL** de solução para lavagem. Aspirar todos os líquidos das microcavidades.

7.7 Pipetar **100µL** de HbcAg em cada microcavidade, exceto na microcavidade blank.

7.8 Pipetar **100µL** de conjugado enzimático a cada microcavidade, exceto para a microcavidade blank.

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

7.10 Incubar por **60 min ± 5 min a 37°C ± 2°C**.

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

7.12 Lavar as microcavidades conforme descrito no item 7.6

7.13 Pipetar **200µL** de solução de substrato (ver parágrafo do reagente) em todas as microcavidades.

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

7.15 Pipetar **100µL** de reagente bloqueador em todas as microcavidades.

7.16 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 usar 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 leitura maior.

Absorbância Média do Controle Negativo: Calcular a absorbância média dos Controles Negativos. O teste é válido se a absorbância média dos Controles Negativos forem inferiores a 0,070; caso contrário o teste deve ser considerado inválido.

Absorbância Média do Controle Positivo: Calcular a absorbância média dos Controles Positivos. A diferença entre a média do Controle Positivo e a média do Controle Negativo deve ser superior a 0,500; caso contrário o teste deve ser considerado inválido.

Valor “cut-off”: Média de absorbância dos Controles Negativos + 0,300.

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: $(0,036 + 0,040 + 0,038 + 0,046) : 4 = 0,040$ (Média do Controle Negativo $< 0,070$)

Controles Positivos: $(1,020 + 1,080) : 2 = 1,050$ (Média do Controle Positivo)
 $(1,050 - 0,040) = 1,010$ ($> 0,500$)

O teste deve ser considerado válido.

Valor “cut-off”: $(0,040 + 0,300) = 0,340$

9.2 INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

As amostras com uma absorbância maior que o valor de “cut-off” devem ser consideradas reativas para o anti-HBc IgM. As amostras com uma absorbância menor que o valor de “cut-off” devem ser consideradas não reativas para anti-HBc IgM.

As amostras não reativas no primeiro ensaio (absorbância menor que o valor “cut-off”) devem ser consideradas negativas para o anti-HBc IgM. As amostras reativas no primeiro ensaio (absorbância maior 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 IgM. Amostras reativas repetidamente devem ser consideradas positivas para anti-HBc IgM. As amostras com uma absorvância entre o valor de “cut-off” \pm 10% (zona cinza) devem ser consideradas questionável e ser retestada.

- Absorvância menor que o valor “cut-off”: amostras negativas anti-HBc IgM.
- Absorvância maior ou igual ao valor “cut-off”: amostras positivas anti-HBc IgM.
- Absorvância dentro da faixa do “cut-off \pm 10%” (zona cinza): amostras questionáveis para anti-HBc IgM.

10. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

10.1 Especificidade diagnóstica

A especificidade diagnóstica do método foi avaliada em um grupo de 500 amostras (doadores de sangue e pacientes negativos hospitalizados), com um resultado \geq 98%.

10.2 Sensibilidade diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada em mais de 200 amostras positivas, com um resultado \geq 98%.

10.3 Especificidade analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a capacidade do teste em detectar precisamente o 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 também pode ser expressa como o limite de detecção, que é a quantidade mínima do analito específico detectável pelo ensaio. O limite de detecção calculado com base no painel PEI é de 52 UI/ml por Anti-HBc IgM.

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 IgM. Para transformar o resultado qualitativo em parâmetro quantitativo, as densidades ópticas para o soro foram divididas pelo valor do “cut-off”, obtendo então uma relação amostra/cut-off (S/CO).

Repetibilidade (Intra-ensaio)

Soro	Média	± (S/CO)	S.D.	C.V. %	Replicatas Nº
A	0,08	±	0,02	21,7	10
B	1,22	±	0,15	12,5	10
C	10,84	±	0,27	2,6	10

Reprodutibilidade (Inter-ensaio)

Soro	Médias	± (S/CO)	S.D.	C.V. %	Replicatas Nº
A	1,31	±	0,09	6,91	10
B	3,29	±	0,23	6,9	10
C	10,58	±	0,99	9,3	10

11. LIMITES DO ENSAIO

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

ESQUEMA DE ENSAIO

Diluir as amostras 1:51; em seguida:

Microcavidades	"Blank"	NEG	POS	Amostras
NEG	-----	10 µl	-----	-----
POS	-----	-----	10 µL	-----
Amostras diluídas	-----	-----	-----	10 µL
Dil. Amostra	-----	200 µl	200 µl	200 µl

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

HBcAg	-----	100 µL	100 µL	100 µL
Conjugado Enzimático	-----	100 µL	100 µL	100 µL

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

TMB + SUBS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
------------	--------	--------	--------	--------

- _ Incubação: 37°C ± 2°C, 20' ± 2'.

Reagente bloqueador	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
---------------------	--------	--------	--------	--------










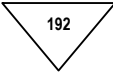



Leitura: 450 - 405 nm

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Hawkes R.A., Roughton C.R., Ferfusion V and Lehmann N.I. Us of Immunoglobulin in M Antibody to Hepatitis B Core Antigen in Diagnosis of Viral Hepatitis,. J. Clin. Microbiol. 11:581-583, 1980.
- 2 - Gerlich W.J. and al. Selective Detection of IgM Antibody Against Core Antigen of the Hepatitis B Virus by a Modified Enzyme Immunoassay.
- 3 - Lemon S.M., Gates N.L, Simms T.B and Bancroft W.H. IgM Antibody to Hepatitis B Core Antigen as a Diagnostic parameter of Acute Infection with Hepatitis B Virus. J. Infect. Dis. 143: 803-809, 1981.
- 4 - Tedder R.S. and Wilson-Croome R. Detection by Radioimmunoassay of IgM Class Antibody to Hepatitis B Core Antigen. A Comparison of two methods. J. Mês. Virol. 6:235-247, 1980.
- 5 - Kryger P. and al. Enzyme – Linked Immunoabsorbent Assay for Detection of Immunoglobulin M Antibody to Hepatitis B Core Antigen. J. Clin Microbiol. 13: 405-409, 1981.
- 6 - Cohen B.J. The IgM Antibody Responses to the Core Antigen of Hepatitis B Virus. J. Med. Virol. 3: 141-149, 1978.
- 7 - Brzosko W.J., Wikulska B, Cianciara J., Babioch L. Immunoglobulin Classes of Antibody to Hepatitis B Core Antigen. J. Infect. Dis. 132: 1-5, 1975.

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

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: 80103990083

Conservar entre 2°C - 8°C

Resp. Técnico - Sueli Sayori Nakano / CRBM 4501

Revisão 01