

SD HBsAg ELISA 3.0
Manual de instruções

Explicação do teste

SD HBsAg ELISA 3.0 é um ensaio imunoenzimático para detecção qualitativa do antígeno de superfície do vírus da hepatite B em soro ou plasma humanos.

SD HBsAg ELISA 3.0 contém uma microplaca com poços pré-revestidos com anticorpos anti- antígeno de superfície do vírus da hepatite B (Anti-HBs). Durante a primeira incubação, o HBsAg da amostra do paciente é ligado ao Anti HBs do poço da placa. Este complexo por sua vez é ligado ao conjugado, formando então um sanduíche. O material não ligado é então removido por aspiração e lavagem. A atividade enzimática encontrada nos poços será diretamente proporcional à concentração de HBsAg na amostra, e é evidenciada pela incubação da fase sólida com o substrato TMB em um substrato tampão. A leitura colorimétrica será realizada através de um espectrofotômetro a 450nm. SD HBsAg ELISA 3.0 é um teste de sanduíche duplo com alta sensibilidade e especificidade para detecção de HBsAg. Este teste destina-se ao uso profissional e deve ser utilizado para detecção do vírus da hepatite B.

Materiais contidos no kit

Material/Reagente		Kit para 96 testes	Kit para 480 testes
Microplaca	96 poços sensibilizados com anticorpos anti-antígeno de superfície da hepatite B. Conservar entre 2 a 8 graus Celsius, em embalagem aluminizada.	1 placa	5 placas
Conjugado enzimático	Conjugado Anti HBs peróxi-rábano de cavalo (HRPO). Conservante: Proclin 300 (q.s.p.). Pronto para uso.	1 frasco com 5 ml	1 frasco com 25 ml
Controle positivo	Soro humano HBsAg positivo. Conservante: Proclin 300 (q.s.p.).	1 frasco com 2 ml	1 frasco com 3 ml
Controle negativo	Soro humano HBsAg negativo. Conservante: Proclin 300 (q.s.p.).	1 frasco com 2 ml	1 frasco com 4 ml
Substrato TMB A	Acetato de sódio, peróxido de hidrogênio e gentamicina. Armazenar o frasco fechado entre 2 a 8 graus Celsius. Antes do uso, preparar uma solução única de substrato (A +B) 1:1.	1 frasco com 10 ml	1 frasco com 50 ml
Substrato TMB B	Tetrametilbenzidina (TMB), ácido hidrocloreídrico. Armazenar o frasco fechado entre 2 a 8	1 frasco com 10 ml	1 frasco com 50 ml

	graus Celsius. Antes do uso, preparar uma solução única de substrato (A +B) 1:1.		
Solução de lavagem (20 vezes concentrada)	PBS, Tween 20. Antes do uso, deve-se diluir 25 ml da solução de lavagem concentrada em 500 ml de água destilada (1:20). Caso a solução apresente cristais, re-suspender a mesma colocando-a a 37 graus Celsius por poucos minutos.	1 frasco com 50 ml	2 frascos com 100 ml cada
Solução de parada	Ácido sulfúrico 1,6 N. Pronto para uso.	1 frasco com 20 ml	1 frasco com 100 ml
Adesivo selador de placa			
Instruções de uso			

Precauções

Para obter resultados reproduzíveis, as regras abaixo devem ser seguidas:

- Apenas para uso diagnóstico *in vitro*;
- Não misturar reagentes de diferentes lotes;
- Utilize óculos de proteção, a fim de evitar contaminação por íons metálicos e substâncias oxidativas;
- Utilize luvas descartáveis durante todo o ensaio e enquanto manuseia substâncias potencialmente infectantes;
- O substrato e solução de parada devem ser manuseados com cuidado. Evite contato com a pele, olhos e membranas mucosas.

Coleta e armazenagem de amostras

- Colete o sangue total por venipunção;
- Centrifugue o sangue total para obter amostras de soro ou plasma;
- Se a amostra não for imediatamente testada, ela deve ser armazenada entre 2 a 8 graus Celsius. Para períodos de armazenagem superior a três dias, o congelamento é recomendado. As amostras devem ser trazidas à temperatura ambiente antes do uso.

Preparo dos reagentes

- Solução de lavagem: dilua 25 ml da solução de lavagem concentrada em 500 ml de água destilada (1:20).
- Substrato A e B: prepare um substrato único através da adição de 1:1 dos substratos A e B.

Procedimento do teste

- Deixe que todos os componentes do kit e amostra atinjam temperatura ambiente;
- Reserve 3 poços da microplaca para controle negativo, 2 para controle positivo e os poços das amostras a serem testadas;
- Adicione 100 ul de controle negativo nos poços adequados, 100 ul de controle positivo nos poços adequados e 100 ul de amostra nos poços das amostras;
- Pipete 25 ul de conjugado enzimático em cada poço;
- Cubra a microplaca com o adesivo selador e misture gentilmente seu conteúdo por alguns segundos.
- Incube a microplaca a 37 graus C por 60 minutos;

- Lave os poços por 5 vezes com 350 ul de solução de lavagem reconstituída. Em cada lavagem, deixe que a solução permaneça em contato com os poços por pelo menos 10 segundos. O conteúdo dos poços deve ser aspirado;

NOTA: a etapa de lavagem é muito importante para o bom desempenho do teste. Siga cuidadosamente as instruções (volume da solução, quantidade de lavagens e tempo de contato da solução com os poços em cada lavagem).

- Adicione 100 ul da solução de substrato TMB previamente preparada em cada poço;
- Incube os poços por 10 minutos em temperatura ambiente;
- Adicione 100 ul de solução de parada em cada poço;
- Realize a leitura da absorbância dos poços com um espectrofotômetro biométrico a 450 nm com referência 620nm. A leitura deve estar completa em até 30 minutos depois do término do ensaio.

Interpretação dos resultados

Validação do teste

Os valores das absorbâncias individuais dos controles serão usados para calcular o valor principal se:

- Controle negativo: igual ou maior a -0,05 e igual ou menor que 0,200.
- Controle positivo: maior ou igual a 1,00.

Se um dos valores de absorbâncias dos controles negativos estiver fora das especificações, este valor pode ser rejeitado.

Ambos os valores da absorbância dos controles positivos devem estar dentro das especificações. Se algum dos valores não estiver, o teste deve ser re-feito.

Avaliação

Calcule a média dos valores de absorbância dos controles negativos, e então calcule o valor do cut-off adicionando 0,05 a esta média. Abaixo:

A (média dos controles negativos)+0,05= valor cut-off

Assim, as amostras deverão ser classificadas da seguinte maneira:

- Amostras positivas para HBsAg: ABS maior ou igual a cut-off
 - Amostras negativas para HBsAg: ABS menor que cut-off
- Amostras com valores iguais ou muito próximos ao do cut-off, devem primeiramente ser re-testadas em duplicata. Se no re-teste o resultados permanecerem semelhantes ou iguais ao valor do cut-off, esta amostra deve ser submetida a um teste confirmatório.

Limitações e interferências

As instruções de uso devem ser seguidas de acordo com o descrito para a realização dos testes.

Amostras:

- Amostras contendo azida sódica não devem ser utilizadas;
- Amostras pasteurizadas (não menos que 10 horas a 60 graus Celsius) podem ter sua reatividade diminuída, portanto não devem ser utilizadas;
- Amostras inativadas (1 hora a 56 graus Celsius) não prejudicam os resultados dos testes;
- Anticoagulantes como heparina, EDTA e citrato não interferem nos resultados dos testes;
- Amostras hemolíticas devem ser centrifugadas a fim de evitar reação cruzada com constituintes celulares;
- Fatores reumatóides em altos níveis podem elevar a atividade das amostras;
- Amostras lipêmicas e ictericas não prejudicam os resultados dos testes.

Este teste detecta o antígeno de superfície do vírus da hepatite B, e deve ser utilizado como triagem. A falha no procedimento de adição de amostra nas microcavidades da microplaca pode causar resultados falso-negativos. Uma repetição do teste deve ser realizada quando existirem evidências clínicas e os resultados permanecerem negativos.

Armazenagem e estabilidade

Armazenar o kit entre 2 a 8 graus Celsius. O kit fechado (lacrado) pode ser utilizado até sua data de validade, impressa na caixa e rótulo de cada componente.

Estabilidade dos reagentes depois do kit aberto:

Material/Reagente	Estado	Armazenagem	Estabilidade
Microplaca	Depois de aberta	Selada 2 a 8 graus Celsius	1 mês
Conjugado enzimático	Depois de aberto	Frasco fechado 2 a 8 graus Celsius	3 meses
Controle positivo	Depois de aberto	Frasco fechado 2 a 8 graus Celsius	3 meses
Controle negativo	Depois de aberto	Frasco fechado 2 a 8 graus Celsius	3 meses
Substrato TMB A	Depois de aberto	Frasco fechado Protegido da luz 2 a 8 graus Celsius	Data de validade
Substrato TMB B	Depois de aberto	Frasco fechado Protegido da luz 2 a 8 graus Celsius	Data de validade
Solução TMB de trabalho	Reagente A+B (1:1)	Frasco fechado Protegido da luz Temperatura ambiente	1 hora
Solução de lavagem (20 vezes concentrada)	Depois de aberta	Frasco fechado 2 a 8 graus Celsius	Data de validade
Solução de lavagem de trabalho	Diluída 1:20	Frasco fechado 2 a 8 graus Celsius Frasco fechado Temperatura ambiente	3 meses 2 semanas
Solução de parada	Depois de aberta	Frasco fechado Temperatura ambiente	Data de validade

Características do desempenho

SD HBsAg ELISA 3.0 foi testado com amostras clínicas positivas e negativas, e comparado a um teste comercial de HbsAg ELISA.

Referencia	SD HBsAg ELISA3.0			Resultado Total
	Resultados	Positivo	Negativo	
Kit Comercial	Positivo	187	0	187
ELISA	Negativo	0	251	251
Resultado total		187	251	438

- Sensibilidade: 100%
- Especificidade: 100%

Concordância: 100%

Precisão: as precisões intra-ensaio e entre-ensaio foram determinadas através dos testes de 10 replicatas de 3 diferentes amostras: uma

negativa, uma positiva baixa e uma positiva alta. Os coeficientes de variação (CV%) estiveram em 10% todo o tempo.

Bibliografia e leitura sugerida

Hollinger, F.B. and Dienstag, J.L. Hepatitis B and D Viruses. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. (eds.) Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Washington, D.C.: ASM Press; pp. 1033-1049 (1995).

Prince, A.M. 1968. An Antigen Detected in the Blood During the Incubation Period of Serum Hepatitis. Proc. Natl Acad Sci USA; 60: 814-821.

Mosley, J.W. 1975. The Epidemiology of Viral Hepatitis: An Overview. Am J Med Sci; 270: 253-270.

Produzido por:

STANDARD DIAGNOSTICS INC.

34, Pajang-dong, Jangan-ku, Suwon-si
Kyonggi-do
Coréia
<http://www.standardia.com>

Importado e distribuído por:

RZ DE OLIVEIRA DIAGNÓSTICA - EPP

Rua Campevas, 627
CEP.05016-010 - São Paulo - SP
CNPJ 05.328.040/0001-80

Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA 80313040032

Téc. Resp. Dra. Renata Zuculin de Oliveira - CRF-SP 37986

POTENCIALMENTE INFECTANTE

CONSERVAR A TEMPERATURA 2°C A 30°C

PARA DESCARTE, CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Quaisquer dúvidas técnicas no manuseio deste kit ou no seu procedimento, contatar a nossa **ASSESSORIA CIENTÍFICA**.

Atendimento ao consumidor - Fone (011)-3871-0095