

# HBsAg<sub>one</sub>

## Version ULTRA

**Fourth generation Enzyme  
Immunoassay (ELISA)  
for the determination of  
Hepatitis B surface Antigen or HBsAg  
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

## HBsAg One version ULTRA

### A. INTENDED USE

Fourth generation Enzyme Immunoassay (ELISA) for the one-step determination of Hepatitis B surface Antigen or HBsAg in human plasma and sera.

The kit is intended for the screening of blood units, is able to detect HBsAg mutants and finds application in the follow-up of HBV-infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

### B. INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) defines Hepatitis B Virus infection as follows:

"Hepatitis B is one of the major diseases of mankind and is a serious global public health problem. Hepatitis means inflammation of the liver, and the most common cause is infection with one of 5 viruses, called hepatitis A,B,C,D, and E. All of these viruses can cause an acute disease with symptoms lasting several weeks including yellowing of the skin and eyes (jaundice); dark urine; extreme fatigue; nausea; vomiting and abdominal pain. It can take several months to a year to feel fit again. Hepatitis B virus can cause chronic infection in which the patient never gets rid of the virus and many years later develops cirrhosis of the liver or liver cancer.

HBV is the most serious type of viral hepatitis and the only type causing chronic hepatitis for which a vaccine is available. Hepatitis B virus is transmitted by contact with blood or body fluids of an infected person in the same way as human immunodeficiency virus (HIV), the virus that causes AIDS. However, HBV is 50 to 100 times more infectious than HIV. The main ways of getting infected with HBV are: (a) perinatal (from mother to baby at the birth); (b) child- to-child transmission; (c) unsafe injections and transfusions; (d) sexual contact.

Worldwide, most infections occur from infected mother to child, from child to child contact in household settings, and from reuse of un-sterilized needles and syringes. In many developing countries, almost all children become infected with the virus. In many industrialized countries (e.g. Western Europe and North America), the pattern of transmission is different. In these countries, mother-to-infant and child-to-child transmission accounted for up to one third of chronic infections before childhood hepatitis B vaccination programmes were implemented. However, the majority of infections in these countries are acquired during young adulthood by sexual activity, and injecting drug use. In addition, hepatitis B virus is the major infectious occupational hazard of health workers, and most health care workers have received hepatitis B vaccine.

Hepatitis B virus is not spread by contaminated food or water, and cannot be spread casually in the workplace. High rates of chronic HBV infection are also found in the southern parts of Eastern and Central Europe. In the Middle East and Indian sub-continent, about 5% are chronically infected. Infection is less common in Western Europe and North America, where less than 1% are chronically infected.

Young children who become infected with HBV are the most likely to develop chronic infection. About 90% of infants infected during the first year of life and 30% to 50% of children infected between 1 to 4 years of age develop chronic infection. The risk of death from HBV-related liver cancer or cirrhosis is approximately 25% for persons who become chronically infected during childhood. Chronic hepatitis B in some patients is treated with drugs called *interferon* or *lamivudine*, which can help some patients. Patients with cirrhosis are sometimes given liver transplants, with varying success. It is preferable to prevent this disease with vaccine than to try and cure it.

Hepatitis B vaccine has an outstanding record of safety and effectiveness. Since 1982, over one billion doses of hepatitis B vaccine have been used worldwide. The vaccine is given as a series of three intramuscular doses. Studies have shown that the vaccine is 95% effective in preventing children and adults from developing chronic infection if they have not yet been infected. In many countries where 8% to 15% of children used to become chronically infected with HBV, the rate of chronic infection has been reduced to less than 1% in immunized groups of children. Since 1991, WHO has called for all countries to add hepatitis B vaccine into their national immunization programs."

Hepatitis B surface Antigen or HBsAg is the most important protein of the envelope of Hepatitis B Virus, responsible for acute and chronic viral hepatitis.

The surface antigen contains the determinant "a", common to all the known viral subtypes, immunologically distinguished by two distinct subgroups (ay and ad).

The ability to detect HBsAg with high sensitive immunoassays in the last years has led to an understanding of its distribution and epidemiology worldwide and to radically decrease the risk of infection in transfusion.

### C. PRINCIPLE OF THE TEST

A mix of mouse monoclonal antibodies specific to the determinants "a", "d" and "y" of HBsAg is fixed to the surface of microwells. Patient's serum/plasma is added to the microwell together with a second mix of mouse monoclonal antibodies, conjugated with Horseradish Peroxidase (HRP) and directed against a different epitope of the determinant "a" and against "preS".

The specific immunocomplex, formed in the presence of HBsAg in the sample, is captured by the solid phase.

At the end of the one-step incubation, microwells are washed to remove unbound serum proteins and HRP conjugate.

The chromogen/substrate is then added and, in the presence of captured HBsAg immunocomplex, the colorless substrate is hydrolyzed by the bound HRP conjugate to a colored end-product. After blocking the enzymatic reaction, its optical density is measured by an ELISA reader.

The color intensity is proportional to the amount of HBsAg present in the sample.

The version ULTRA is particularly suitable for automated screenings and is able to detect "s" mutants.

### D. COMPONENTS

The standard configuration contains reagents to perform 192 tests and is made of the following components:

#### 1. Microplate MICROPLATE

n° 2. 12 strips of 8 breakable wells coated with anti HBsAg, affinity purified mouse monoclonal antibodies, specific to "a", "y" and "d" determinants, and sealed into a bag with desiccant.

#### 2. Negative Control CONTROL -

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains goat serum, 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is pale yellow color coded.

#### 3. Positive Control CONTROL +

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains goat serum, non infectious recombinant HBsAg, 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.02% gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The positive control is color coded green.

#### 4. Calibrator CAL ...

n° 2 vials. Lyophilized calibrator. To be dissolved with EIA grade water as reported in the label. Contains fetal bovine serum, non infectious recombinant HBsAg at 0.5 IU/ml (2<sup>nd</sup> WHO international standard for HBsAg, NIBSC code 00/588), 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.02% gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

**Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .**

#### 5. Wash buffer concentrate WASHBUF 20X

2x60ml/bottle. 20X concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

### 6. Enzyme Conjugate Diluent CONJ DIL

2x16ml/vial. Ready to use and pink/red color coded reagent. It contains 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 1% normal mouse serum, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives. The solution is normally opalescent.

### 7. Enzyme Conjugate CONJ 20X

2x1ml/vial. 20X concentrated reagent. It contains Horseradish Peroxidase (HRP) labeled mouse monoclonal antibodies to HBsAg, determinant "a" and "preS", 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

### 8. Chromogen/Substrate SUBS TMB

2x25ml/bottle. It contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine (TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.**

### 9. Sulphuric Acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x25ml/bottle. It contains 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.

**Note: Attention: Irritant** (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

### 10. Plate sealing foils n° 4

### 11. Package insert

#### Important note:

Only upon specific request, Dia.Pro can supply reagents for 96, 480, 960 tests, as reported below:

	N°1	N°5	N°10
Microplates			
Negative Control	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Positive Control	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Calibrator	N° 1 vial	N° 5 vials	N° 10 vials
Wash buffer concentrate	1x60ml/vial	5x60ml/vial	4x150ml/vial
Enzyme conjugate	1x0.8ml/vial	1x4ml/vial	2x4ml/vial
Conjugate Diluent	1x16ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Chromogen/Substrate	1x25ml/vial	3x42ml/vial	2x125ml/vial
Sulphuric Acid	1x15ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Plate sealing foils	N° 2	N° 10	N° 20
Package insert	N° 1	N° 1	N° 1
Number of tests	96	480	960
Code SAG1ULTRA.CE	96	480	960

### E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (150ul, 100ul and 50ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet), capable to provide shaking at 1300 rpm+/-150, set at +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blinking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

### F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
6. Upon receipt, store the kit at 2.8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-use of the device and up to 6 months.
12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
16. The Stop Solution is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
17. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Eng	Page	4 of 9	Rev.:	5	Date:	2019/11
-------	----------------------	------	--------	-------	---	-------	---------

## G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

- Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
- Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
- Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
- Haemolysed (red) and lipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as well as they could give rise to false positive results. Specimens with an altered pathway of coagulation, presenting particles after blood collection and preparation of serum/plasma as those coming from hemodialized patients, could give origin to false positive results.
- Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen sample should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
- If some turbidity is present or presence of microparticles is suspected after thawing, filter the sample on a disposable 0.2-0.8µ filter to clean it up for testing or use the two-steps alternative method.

## H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 6 months.

### 1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned green, indicating a defect in conservation. In this case, call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back inside the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°...8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

### 2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

### 3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. The positive control does not contain any infective HBV as it is composed of recombinant synthetic HBsAg.

### 4. Calibrator:

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilized powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex. The solution is not stable. Store the Calibrator frozen in aliquots at -20°C.

### 5. Wash buffer concentrate:

The 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. In the preparation avoid foaming as the presence of bubbles could give origin to a bad washing efficiency.

**Note:** Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2°...8° C.

### 6. Enzyme conjugate:

The working solution is prepared by diluting the 20X concentrated reagent into the Conjugate Mix well on vortex before use.

Avoid any contamination of the liquid with oxidizing chemicals, dust or microbes. If this component has to be transferred, use only plastic sterile disposable containers.

**Important note:** The working solution is not stable. Prepare only the volume necessary for the work of the day. As an example when the kit is used in combination with other instruments or manually, dilute 0.1 ml 20X Conjugate with 1.9 ml Conjugate Diluent into a disposable plastic vial and mix carefully before use.

### 7. Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well by end-over-end mixing.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

### 8. Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well by end-over-end mixing.

**Attention:** Irritant (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

*Legenda:*

**Warning H statements:**

**H315** – Causes skin irritation.

**H319** – Causes serious eye irritation.

**Precautionary P statements:**

**P280** – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

**P302 + P352** – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

**P332 + P313** – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

**P305 + P351 + P338** – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

**P337 + P313** – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

**P362 + P363** – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

## I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

- Micropipettes** have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (70% ethanol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of ±2%.
- The **ELISA incubator** has to be set at +37°C (tolerance of ±1°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
- In case of **shaking** during incubations, the instrument has to ensure 350 rpm ±150. Amplitude of shaking is very important as a wrong one could give origin to splashes and therefore to some false positive result.
- The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with

Doc.:	INS SAGIULTRA.CE/Eng	Page	5 of 9	Rev.:	5	Date:	2019/11
-------	----------------------	------	--------	-------	---	-------	---------

deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution.

The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

5. **Incubation times** have a tolerance of  $\pm 5\%$ .
6. The **microplate reader** has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth  $\leq 10$  nm; (b) absorbance range from 0 to  $\geq 2.0$ ; (c) linearity to  $\geq 2.0$ ; (d) repeatability  $\geq 1\%$ . Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
7. When using **ELISA automated workstations**, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling, etc.) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated by checking full matching the declared performances of the kit. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set paying particular attention to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. The carry over effect must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
8. When using automatic devices, in case the vial holder of the instrument does not fit with the vials supplied in the kit, transfer the solution into appropriate containers and label them with the same label peeled out from the original vial. This operation is important in order to avoid mismatching contents of vials, when transferring them. When the test is over, return the secondary labeled containers to 2..8°C, firmly capped.
9. **Dia.Pro's customer service** offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure full compliance with the essential requirements of the assay. Support is also provided for the installation of new instruments to be used in combination with the kit.

#### L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dilute the 20X concentrated Enzyme Conjugate with its Diluent as reported.
5. Dissolve the Calibrator as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.

7. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

#### M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

##### Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument dispense first 150 ul controls & calibrator, then all the samples and finally 100 ul diluted Enzyme Conjugate.

For the pre-washing step (point 1 of the assay procedure) and all the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

##### Manual Assay:

1. Place the required number of strips in the plastic holder and wash them once to hydrate wells. Carefully identify the wells for controls, calibrator and samples.

**Important note:** *Pre washing (1 cycle: dispensation of 350ul/well of washing solution+ aspiration) is fundamental to obtain reliable and specific results both in the manual and in the automatic procedures. Do not omit it !*

2. Leave the A1 well empty for blanking purposes.
3. Pipette 150ul of the Negative Control in triplicate, 150ul of the Calibrator in duplicate and then 150ul of the Positive Control in single followed by 150ul of each of the samples.
4. Check for the presence of samples in wells by naked eye (there is a marked color difference between empty and full wells) or by reading at 450/620nm. (samples show OD values higher than 0.100).
5. Dispense 100ul diluted Enzymatic Conjugate in all wells, except for A1, used for blanking operations.

**Important note:** *Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when the conjugate is dispensed. Contamination might occur.*

6. Following addition of the conjugate, check that the color of the samples have changed from yellowish to pink/red and then incubate the microplate for **120 min at +37°C**.

##### Important notes:

- a. *Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.*
- b. *If the procedure is carried out on shaking, be sure to deliver the rpm reported for in Section I.3 as otherwise intra-well contamination could occur.*

- When the first incubation is over, wash the microwells as previously described (section I.4)
- Pipette 200 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1 included.

**Important note:** Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **18-24°C for 30 min**. Wells dispensed with the positive control, the calibrator and positive samples will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells to stop the enzymatic reaction, using the same pipetting sequence as in step 8. Addition of the acid solution will turn the positive control, the calibrator and positive samples from blue to yellow/brown.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.6 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

**Important general notes:**

- Ensure that no fingerprints or dust are present on the external bottom of the microwell before reading. They could generate false positive results on reading.
- Reading should ideally be performed immediately after the addition of the acid solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self-oxidation of the chromogen can occur leading to a higher background.
- When samples to be tested are not surely clean or have been stored frozen, the assay procedure reported below is recommended as long as it is far less sensitive to interferences due to hemolysis, hyperlipaemia, bacterial contamination and fibrin microparticles. The assay is carried out in two-steps at +37°C on shaking at 350 rpm ±150 as follows:
  - dispense 100 µl of controls, calibrator and samples
  - incubate 60 min at +37°C on shaking
  - wash according to instructions (section I.4)
  - dispense 100 µl diluted enzyme tracer
  - incubate 30 min at +37°C on shaking
  - wash
  - dispense 100 µl TMB&H2O2 mix
  - incubate 30 min at r.t. on shaking
  - stop and read

In this procedure the pre-wash can be omitted. This method shows performances similar to the standard one and therefore can be used in alternative.

- The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.

**N. ASSAY SCHEME**

Operations	Procedure
Pre-Washing step	n° 1 cycle
Controls&Calibrator&samples	150 µl
Diluted Enzyme Conjugate	100 µl
<b>1<sup>st</sup> incubation</b>	<b>120 min</b>
Temperature	+37°C
Washing steps	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Chromogen/Substrate	200µl
<b>2<sup>nd</sup> incubation</b>	<b>30 min</b>
Temperature	room
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported in the following section:

**Microplate**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control  
CAL = Calibrator PC = Positive Control S = Sample

**O. INTERNAL QUALITY CONTROL**

A check is performed on the controls/calibrator any time the kit is used in order to verify whether the expected OD450nm or S/Co values have been matched in the analysis.

Ensure that the following results are met:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control (NC)	< 0.050 mean OD450nm value after blanking
Calibrator 0.5 IU/ml	S/Co ≥ 2
Positive Control	> 1.000 OD450nm value

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
<b>Blank well</b> > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
<b>Negative Control (NC)</b> > 0.050 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to spills of positive samples or of the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

<b>Calibrator</b> S/Co < 2	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. that the procedure has been correctly performed;</li> <li>2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of calibrator)</li> <li>3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;</li> <li>4. that no external contamination of the calibrator has occurred.</li> </ol>
<b>Positive Control</b> < 1.000 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. that the procedure has been correctly performed;</li> <li>2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value &gt; 0.050).</li> <li>3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;</li> <li>4. that no external contamination of the positive control has occurred.</li> </ol>

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

**Important note:**

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

**P. CALCULATION OF THE CUT-OFF**

The test results are calculated by means of a cut-off value determined on the mean OD450nm/620-630nm value of the negative control (NC) with the following formula:

$$NC + 0.050 = \text{Cut-Off (Co)}$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

**Important note:** When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

**Q. INTERPRETATION OF RESULTS**

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm/620-630nm (S) and the Cut-Off value (Co), mathematically S/Co, according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 – 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient is not infected by HBV and that the blood unit may be transfused.

Any patient showing an equivocal result should be retested on a second sample taken 1-2 weeks after the initial sample; the blood unit should not be transfused.

A positive result is indicative of HBV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

**Important notes:**

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Any positive result must be confirmed first by repeating the test on the sample, after having filtered it on 0.2-0.8 u filter to remove any microparticles interference. Then, if still positive, the sample has to be submitted to a confirmation test before a diagnosis of viral hepatitis is released.
3. When test results are transmitted from the laboratory to another department, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 11):

The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.012 – 0.008 – 0.010 OD450nm  
Mean Value: 0.010 OD450nm  
Lower than 0.050 – Accepted  
Positive Control: 2.489 OD450nm  
Higher than 1.000 – Accepted  
Cut-Off = 0.010+0.050 = 0.060  
Calibrator: 0.350 - 0.370 OD450nm  
Mean value: 0.360 OD450nm S/Co = 6.0  
S/Co higher than 2.0 – Accepted  
Sample 1: 0.028 OD450nm  
Sample 2: 1.690 OD450nm  
Sample 1 S/Co < 0.9 = negative  
Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

**R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC). Version ULTRA proved to be at least equivalent to the original design in a study conducted for the validation of the new version.

**1. Analytical Sensitivity**

The limit of detection of the assay has been calculated on the 2<sup>nd</sup> WHO international standard, NIBSC code 00/588.

In the following table, results are given for three lots (P1, P2 and P3) of the version ULTRA in comparison with the reference device (Ref.):

WHO IU/ml	Lot # P1 S/Co	Lot # P2 S/Co	Lot # P3 S/Co	Ref. S/Co
0.4	4.6	4.8	4.6	4.6
0.2	2.3	2.4	2.4	2.4
0.1	1.4	1.4	1.5	1.2
0.05	0.8	0.8	1.0	0.7
0.025	0.6	0.6	0.6	0.4
FCS (NC)	0.3	0.2	0.3	0.1

The assay shows an Analytical Sensitivity better than 0.1 WHO IU/ml of HBsAg.

In addition two panels of sensitivity supplied by EFS, France, and by SFTS, France, were tested and gave in the best conditions the following results:

### Panel EFS Ag HBs HB1-HB6 lot n° 04

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
HB1	diluent	/	0,2
HB2	adw2+ayw3	0.05	0,6
HB3	adw2+ayw3	0.1	<b>1,0</b>
HB4	adw2+ayw3	0.2	<b>1,8</b>
HB5	adw2+ayw3	0.3	<b>2,4</b>
HB6	adw2+ayw3	0.5	<b>4,2</b>

### Sensitivity panel SFTS, France, Ag HBs 2005

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
171	Adw2 + ayw3	2.21 ± 0.15	<b>15,4</b>
172	Adw2 + ayw3	1.18 ± 0.10	<b>8,7</b>
173	Adw2 + ayw3	1.02 ± 0.05	<b>6,1</b>
174	Adw2 + ayw3	0.64 ± 0.04	<b>4,0</b>
175	Adw2 + ayw3	0.49 ± 0.03	<b>3,4</b>
176	Adw2 + ayw3	0.39 ± 0.02	<b>2,6</b>
177	Adw2 + ayw3	0.25 ± 0.02	<b>2,0</b>
178	Adw2 + ayw3	0.11 ± 0.02	<b>1,3</b>
179	Adw2 + ayw3	0.06 ± 0.01	<b>0,9</b>
180	Adw2 + ayw3	0.03 ± 0.01	0,8
181	Adw2	0.5 – 1.0	<b>4,7</b>
182	Adw4	0.5 – 1.0	<b>3,6</b>
183	Adr	0.5 – 1.0	<b>4,5</b>
184	Ayw1	0.5 – 1.0	<b>5,1</b>
185	Ayw2	0.5 – 1.0	<b>6,4</b>
186	Ayw3	0.5 – 1.0	<b>7,3</b>
187	Ayw3	0.5 – 1.0	<b>5,8</b>
188	Ayw4	0.5 – 1.0	<b>6,9</b>
189	Ayr	0.5 – 1.0	<b>6,1</b>
190	diluent	/	0,6

The panel # 808, supplied by Boston Biomedical Inc., USA, was also tested to define the limit of sensitivity. Results in the best conditions are as follows :

### BBI panel PHA 808

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
01	ad	2,49	<b>10,2</b>
02	ad	1,17	<b>4,8</b>
03	ad	1,02	<b>4,3</b>
04	ad	0,96	<b>3,8</b>
05	ad	0,69	<b>2,9</b>
06	ad	0,50	<b>2,2</b>
07	ad	0,41	<b>1,5</b>
08	ad	0,37	<b>1,3</b>
09	ad	0,30	<b>1,2</b>
10	ad	0,23	<b>1,0</b>
11	ay	2,51	<b>11,2</b>
12	ay	1,26	<b>5,9</b>
13	ay	0,97	<b>4,1</b>
14	ay	0,77	<b>3,7</b>
15	ay	0,63	<b>2,0</b>
16	ay	0,48	<b>2,4</b>
17	ay	0,42	<b>2,0</b>
18	ay	0,33	<b>1,8</b>
19	ay	0,23	<b>1,6</b>
20	ay	0,13	<b>1,1</b>
21	negative	/	0,6

## 2. Diagnostic Sensitivity:

The diagnostic sensitivity was tested according to what required by Common Technical Specifications (CTS) of the directive 98/79/EC on IVD for HBsAg testing.

Positive samples, including HBsAg subtypes and a panel of "s" mutants from most frequent mutations, were collected from

different HBV pathologies (acute, a-symptomatic and chronic hepatitis B) or produced synthetically, and were detected positive in the assay.

All the HBsAg known subtypes, "ay" and "ad", and isoforms "w" and "r", supplied by CNTS, France, were tested in the assay and determined positive by the kit as expected.

An overall value of 100% has been found in a study conducted on a total number of more than 400 samples positive with the original reference IVD code SAG1.CE, CE marked.

A total of 30 sero-conversions were studied, most of them produced by Boston Biomedica Inc., USA.

Results obtained by examining eight panels supplied by Boston Biomedica Inc., USA, are reported below for the version ULTRA in comparison with the reference device code SAG1.CE.

Panel ID	1 <sup>st</sup> sample positive	HBsAg subtype	HBsAg ng/ml	Version ULTRA S/Co	Ref. device S/Co
PHM 906	02	ad	0.5	<b>3,7</b>	<b>1,4</b>
PHM 907 (M)	06	ay	1.0	<b>4,4</b>	<b>2,9</b>
PHM 909	04	ad	0.3	<b>1,2</b>	0,8
PHM 914	04	ad	0.5	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>
PHM 918	02	ad	0.1	<b>1,8</b>	0,5
PHM 923	03	ay	< 0.2	<b>2,2</b>	<b>1,2</b>
PHM 925	03	Ind.	n.d.	<b>1,4</b>	0,9
PHM 934	01	ad	n.d.	<b>1,0</b>	0,8

## 3. Diagnostic Specificity:

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte. In addition to the first study, where more than 5000 negative samples from blood donors (two blood centers), classified negative with a CE marked device in use at the laboratory of collection were examined, the diagnostic specificity was recently assessed by testing a total of 2288 negative blood donors on seven different lots. A value of specificity of 100% was found.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

Samples derived from patients with different viral (HCV, HAV) and non viral pathologies of the liver that may interfere with the test were examined. No cross reaction were observed.

## 4. Precision:

It has been calculated for the version ULTRA on two samples examined in 16 replicates in 3 different runs for three lots.

Results are reported in the following tables:

Average values Total n = 144	Negative Sample	Calibrator 0.5 IU/ml
OD450nm	0.026	0.332
Std.Deviation	0.004	0.027
CV %	16%	8%

The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.



## S. LIMITATIONS

Repeatable false positive results were assessed on freshly collected specimens in less than 0.1% of the normal population, mostly due to high titers Heterophilic Anti Mouse Antibodies (HAMA).

Interferences in fresh samples were also observed when they were not particles-free or were badly collected (see chapter G). Old or frozen samples, presenting fibrin clots, crioglobulins, lipid-containing micelles or microparticles after storage or thawing, can generate false positive results.

## REFERENCES

1. Aach R.D., Grisham J.W., Parker S.W.. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc.Natl.Acad.Sci..USA, 68:1956, 1971.
2. Blumerg B.S., Suinick A.I., London W.T.. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. Bull.N.Y.Acad.Med.. 44:1566, 1968.
3. Boniolo A., DAVIS M., Matteja R.. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies against hepatitis B surface antigen. J.Immunol.Meth.. 49:1, 1982.
4. Caldwell C.W., Barpet J.T.. Enzyme immunoassay for hepatitis B and its comparison to other methods. Cli.Chim.Acta 81: 305, 1977
5. Fazekas S., De St.Groth, Scheidegger D.. production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Meth.. 35: 1, 1980
6. Reesink H.W.. et al.. Comparison of six 3<sup>rd</sup> generation tests for the detection of HBsAg. Vox.Sang.. 39:61, 1980
7. Rook G.A.W.. Chromogens for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using horseradish peroxidase. Lepr.Rev. 52: 281, 1981
8. Schroder J.. Monoclonal antibodies: a new tool for reasearch and immunodiagnostic. Med.Biol.. 58: 281, 1981
9. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. J.Med.Virol. 1999;59(1):19-24

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

**Manufacturer:**

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



0318



# HBsAg<sub>one</sub>

## Versión ULTRA

**Ensayo inmunoenzimático de cuarta generación (ELISA) para la determinación de antígeno de superficie de la hepatitis B o HBsAg en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"-



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl**  
**Via G.Carducci n° 27**  
**20099 Sesto San Giovanni**  
**Milán - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF SAG1ULTRA.CE  
96/192/480/960 pruebas

## HBsAg One versión ULTRA

### A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático de cuarta generación (ELISA) para la determinación en un paso del antígeno de superficie de la hepatitis B o HBsAg en plasma y suero humanos.

El equipo está diseñado para el cribado en unidades de sangre, es capaz de detectar mutantes de HBsAg y puede aplicarse al seguimiento de pacientes infectados con HBV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

### B. INTRODUCCIÓN.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infección con virus de hepatitis B del siguiente modo:

"La Hepatitis B es una de las enfermedades más importantes que aquejan a la humanidad y constituye un problema de salud pública global. El término hepatitis significa inflamación del hígado y la causa más común es la infección por uno de los cinco virus, denominados A, B, C, D y E. Estos virus pueden causar una enfermedad aguda cuyos síntomas persisten por varias semanas, se caracterizan por el color amarillo de la piel y los ojos (ictericia); orina oscura; fatiga extrema; náuseas; vómitos y dolor abdominal. La recuperación puede tardar de varios meses a un año. Los virus de la Hepatitis son causantes de infecciones crónicas en las que el paciente nunca se libera del virus e incluso, años más tarde, desarrolla cirrosis hepática o cáncer de hígado.

El tipo más serio de hepatitis viral es la causada por el HBV, siendo el único tipo, de los que provocan infección crónica, para el cual existe una vacuna disponible. El virus de la Hepatitis B se transmite por contacto con sangre o fluidos corporales de personas infectadas, de la misma forma que el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), agente causal del SIDA. Sin embargo, el HBV es entre 50 y 100 veces más infeccioso que el HIV. Las principales vías de transmisión del HBV son: (a) vía perinatal (transmisión de madre a hijo durante el parto); (b) de niño a niño; (c) mediante inyecciones y transfusiones inseguras (d) por contacto sexual.

A nivel mundial, la mayor parte de las infecciones ocurre de madre infectada a hijo, de niño a niño en hogares y por la reutilización de agujas y jeringuillas sin previa esterilización. En muchos países en desarrollo, casi todos los niños se infectan con el virus. En muchos países desarrollados (Europa Occidental y Norteamérica), el patrón de transmisión es diferente. En estos países, la transmisión de madre a hijo y de niño a niño representaban cerca de un tercio de las infecciones crónicas antes de que se implantara el programa de vacunación infantil. Sin embargo, la mayoría de las infecciones en estos países se adquiere por la actividad sexual durante la adolescencia, y por el consumo de drogas inyectables. Por otra parte, el virus de la hepatitis B constituye el principal riesgo en el trabajo, dentro del colectivo de los profesionales de la salud, motivo por el cual se ha aplicado la vacunación para la protección de los mismos.

El virus de la hepatitis B no se trasmite por la comida o agua contaminadas, ni por contactos casuales en el ámbito laboral. En zonas del Este y Centro de Europa se han encontrado tasas elevadas de infección crónica por HBV. En el Asia Central y en regiones de la India, aproximadamente el 5% de la población está infectada de forma crónica, mientras que en Europa Occidental y Norteamérica, los índices son menores del 1%.

Los niños infectados con HBV, constituyen el grupo más susceptible a la infección crónica. Aproximadamente el 90% de los niños infectados durante el primer año de vida y entre el 30 y el 50% de los niños infectados entre 1 y 4 años, desarrollan este tipo de infección. La mortalidad por cáncer de hígado o cirrosis asociados al HBV es cerca del 25%, entre las personas que han adquirido la infección crónica en la niñez. En ciertos pacientes, la hepatitis B crónica es tratada con interferones o lamivudinas, lo cual puede ayudar en ocasiones. En algunos casos de cirrosis se han realizado trasplantes de hígado, pero el resultado ha sido variable. La prevención de esta enfermedad a través de la vacunación constituye la mejor opción.

La vacuna contra la Hepatitis B tiene índices de seguridad y eficacia demostrados. A partir de 1982, han sido administradas mundialmente alrededor de mil millones de dosis. Se aplica por vía intramuscular en series de tres dosis. Los estudios realizados demuestran un 95% de

eficacia en la prevención de la infección crónica en niños y adultos sin infección previa. En muchos países donde el índice de infección crónica en niños oscila entre 8% y 15%, se ha observado una reducción a menos del 1% en grupos de niños inmunizados. Desde 1991, la OMS ha hecho un llamamiento para la introducción de la vacuna contra la hepatitis B en todos los programas nacionales de vacunación."

El antígeno de superficie de la hepatitis B o HBsAg es la proteína más importante de la envoltura del virus, responsable de las hepatitis virales agudas y crónicas.

Contiene el determinante "a", común a todos los subtipos virales conocidos, dividido inmunológicamente en dos subgrupos distintos (ay y ad).

En los últimos años la posibilidad de detectar el HBsAg mediante inmunoensayos altamente sensibles, ha permitido comprender su distribución y epidemiología en el mundo así como la gran disminución del riesgo de infección por transfusiones.

### C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

La superficie de los pocillos está recubierta con una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón específicos para los determinantes "a", "d" e "y" de HBsAg. El suero/plasma del paciente se adiciona al pocillo conjuntamente a una segunda mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón conjugada con peroxidasa (HRP) y dirigido contra un epitopo diferente del determinante "a" y contra "preS".

El inmunocomplejo específico, formado en presencia del HBsAg de la muestra, queda capturado en la fase sólida.

Terminada la incubación de un solo paso, los pocillos son lavados para eliminar las proteínas séricas no ligadas y el conjugado HRP.

Después se añade el sustrato/ cromogénico, que en presencia del inmunocomplejo de HBsAg capturado, el sustrato incoloro es hidrolizado por el conjugado HRP unido, generando un producto final coloreado. Después de bloquear la reacción enzimática, su densidad óptica se mide en un lector ELISA.

La intensidad del color es proporcional a la cantidad de HBsAg presente en la muestra.

La versión ULTRA es especialmente idónea para cribados automatizados y es capaz de detectar mutantes "s".

### D. COMPONENTES.

La configuración estándar contiene reactivos suficientes para realizar 192 pruebas y está formada por los siguientes componentes:

#### 1. Microplaca **MICROPLATE**

n° 2. 12 tiras de 8 pocillos rompibles recubiertos con anticuerpos monoclonales de ratón, purificados por afinidad, anti HBsAg, específicos para determinantes "a", "y" y "d" en una bolsa sellada con desecante.

#### 2. Control negativo **CONTROL -**

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene suero de cabra, tampón fosfato 10 mM pH 7.4 +/- 0.1, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control negativo está codificado con color amarillo pálido.

#### 3. Control positivo **CONTROL +**

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene suero de cabra, HBsAg recombinante, no infeccioso, tampón fosfato 10 mM pH 7.4 +/- 0.1, además de sulfato de gentamicina 0.02% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde.

#### 4. Calibrador **CAL ...**

n° 2 viales. Calibrador liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero fetal bovino, HBsAg recombinante no infeccioso a 0.5 IU/mL (2° Estándar internacional O.M.S. para HBsAg, NIBSC código

00/588), tampón fosfato 10 mM pH 7.4 +/- 0.1, así como sulfato de gentamicina 0.02% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

**Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.**

#### 5. Solución de lavado concentrada **WASHBUF 20X**

2x60ml/botella. Solución concentrada 20X. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%.

#### 6. Diluyente de conjugado **CONJ DIL**

2x16ml/vial. Listo para el uso y reactivo codificado con color rosa/rojo. Contiene tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 1% de suero de ratón normal, 5% de BSA, además 0.02% de sulfato de gentamicina y ProClin al 300 0.045% como conservantes. La solución es normalmente opalescente.

#### 7. Conjugado **CONJ 20X**

2x1ml/vial. Reactivo concentrado 20X. Contiene anticuerpos monoclonales de ratón anti HBsAg marcados con peroxidasa (HRP), determinante "a" y preS", tampón Tris 10 mM a pH 6.8 +/- 0.1, 5% BSA, ProClin 300 al 0.045% y sulfato de gentamicina 0.02% como conservantes.

#### 8. Cromógeno/substrato **SUBS TMB**

2x25ml/botella. Contiene solución tamponada citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.02%.

**Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.**

#### 9. Ácido sulfúrico **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M**

1x25ml/botella. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M  
Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

#### 10. Sellador adhesivo, n° 4

#### 11. Manual de instrucciones

#### Nota importante:

A solicitud del cliente, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 96, 480, 960 pruebas, como se describe a continuación:

	N°1	N°5	N°10
<b>Microplacas</b>			
<b>Control negativo</b>	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20 ml/vial
<b>Control Positivo</b>	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20 ml/vial
<b>Calibrador</b>	N° 1 vial	Viales n.° 5	Viales n.° 10
<b>Solución de lavado concentrada</b>	1x60ml/vial	5x60ml/vial	4x150ml/vial
<b>Conjugado</b>	1x0.8ml/vial	1x4ml/vial	2x4ml/vial
<b>Diluyente de conjugado</b>	1x16ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
<b>Cromógeno/substrato</b>	1x25 ml/vial	3x42ml/vial	2x125ml/vial
<b>Ácido Sulfúrico</b>	1x15 ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
<b>Sellador adhesivo</b>	N° 2	N° 10	N° 20
<b>Manual de instrucciones</b>	N° 1	N° 1	N° 1
<b>Número de pruebas</b>	96	480	960
<b>Código SAGIULTRA.CE</b>	.96	.480	.960

#### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (150, 100 y 50 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. *Timer* con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.

5. Incubador termostático de microplacas ELISA (en seco o húmedo), capaz de agitar a 1300 rpm +/- 150, ajustado a +37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

#### F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Cuando el equipo se utiliza para el cribado de unidades de sangre y componentes sanguíneos, debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en ese campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar dicho tipo de análisis.
3. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
5. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno (TMB) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
6. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
7. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
8. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
9. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
11. No usar el producto después de la fecha de vencimiento indicada en el equipo e internamente en los reactivos. En un estudio realizado con un equipo abierto no se ha detectado pérdida de actividad relevante utilizándolo hasta 6 veces y durante un período de hasta 6 meses.
12. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
13. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
14. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser

Doc.:	INS SAGIULTRA.CE/Esp	Página	4 de 9	Rev.:	5	Fecha:	2019/11
-------	----------------------	--------	--------	-------	---	--------	---------

inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.

15. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

16. La solución de parada es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.

17. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

#### G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.

2. Evitar la adición de conservantes a las muestras, en particular azida sódica, ya que podría afectar a la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.

3. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras y la lectura electrónica.

4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o lipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados. al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos porque pueden dar lugar a falsos positivos. Las muestras con una vía de coagulación alterada, que presentan partículas tras la extracción y preparación de suero/plasma y las que proceden de pacientes hemodializados, pueden originar resultados falsos positivos.

5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.

6. Si hay algo de turbidez o se sospecha de la presencia de micropartículas tras descongelar, filtrar la muestra en un filtro de 0.2-0.8µm desechable para las pruebas o usar el método alternativo de dos pasos.

#### H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Estudios de estabilidad realizados en equipos en uso no han arrojado pérdida de actividad significativa en un período de hasta 6 meses.

##### 1. Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de color verde, lo que indicaría un defecto de conservación.

De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de

humedad dentro de la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

##### 2. Control negativo:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

##### 3. Control positivo:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. El control positivo no contiene ningún HBV infeccioso ya que se compone de HBsAg recombinante sintético.

##### 4. Calibrador:

Añadir al polvo liofilizado, el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta; dejar disolver completamente y después mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar. Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

##### 5. Solución de lavado concentrada:

La solución concentrada 20x debe diluirse con agua de calidad EIA hasta 1200 ml y mezclarse suavemente antes del uso. Dado que pueden existir algunos cristales de sal en el vial, debe prestarse atención a que todo el contenido quede disuelto al preparar la solución.

Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de lavado.

**Nota: Una vez diluida, la solución es estable durante una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.**

##### 6. Conjugado:

La solución de trabajo se prepara diluyendo el reactivo concentrado 20X con el Diluyente de Conjugado.

Mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar.

Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables únicamente.

**Nota importante:** La solución de trabajo no es estable. Preparar solamente el volumen necesario para el trabajo del día. Como un ejemplo cuando el equipo se utiliza en combinación con otros instrumentos o manualmente, diluir 0.1 ml de Conjugado 20X con 1.9 ml de Diluyente de Conjugado en un vial de plástico desechable y mezclar cuidadosamente antes de usar.

##### 7. Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien volteando.

Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

##### 8. Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien volteando.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

**H315** – Provoca irritación cutánea.

**H319** – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

**P280** – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

**P302 + P352** – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

**P332 + P313** – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

**P305 + P351 + P338** – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios

Doc.:	INS SAGIULTRA.CE/Esp	Página	5 de 9	Rev.:	5	Fecha:	2019/11
-------	----------------------	--------	--------	-------	---	--------	---------

minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

**P337 + P313** – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

**P362 + P363** – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

## I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las **micropipetas** deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (etanol 70%, lejía 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.
2. La **incubadora ELISA** debe ser ajustada a 37°C (+/- 1°C de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadores secos o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. En caso de **agitación** durante las incubaciones, el instrumento debe garantizar 350 rpm  $\pm$ 150. La amplitud de la agitación es muy importante ya que si es errónea pueden producirse salpicaduras y por lo tanto falsos positivos.
4. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350  $\mu$ l/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
5. Los tiempos de incubación deben tener un margen de  $\pm$ 5%.
6. El **lector de microplacas** debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y, de un segundo filtro de 620-630 nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda  $\leq$  10nm b) Rango de absorbancia de 0 a  $\geq$ 2.0, c) Linealidad  $\geq$ 2.0, reproducibilidad  $\geq$ 1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
7. En caso de usar **sistemas automatizados ELISA**, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación, procesamiento de datos, etc.) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado comprobando la plena coincidencia de los rendimientos declarados del equipo. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente, prestando particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación de muestras y de lavado. Debe estudiarse y controlarse el efecto de arrastre a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de

pocillos adyacentes debido a muestras muy reactivas, lo que provocaría resultados falsos positivos. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa para el cribado en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por serie.

8. Cuando se utilizan instrumentos automáticos, en el caso en que los contenedores para viales del instrumento no se ajusten a los viales del equipo, debe transferirse la solución a contenedores adecuados y marcarlos con la misma etiqueta despegada del vial original. Esta operación es importante para evitar la falta de coincidencia de los contenidos de los viales al transferirlos. Cuando la prueba termine, guardar los contenedores secundarios etiquetados a 2-8°C, firmemente cerrados.
9. El **servicio de atención al cliente en Dia.Pro**, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos esenciales del ensayo. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar en combinación con el equipo.

## L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no están contaminados con partículas ni agregados observables a simple vista. Comprobar que el cromógeno/substrato es incoloro o azul pálido. Comprobar que no se han producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
3. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
4. Diluir el conjugado concentrado 20X con su diluyente, tal y como se describe.
5. Disolver el calibrador como se ha descrito anteriormente.
6. Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego según se describe.
7. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
8. Comprobar que el lector ELISA ha sido encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
9. Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
10. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
11. Asegurarse de que el resto de equipamiento esté disponible y listo para el uso.
12. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

## M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

### Ensayo automatizado:

En caso de que el ensayo se realice automáticamente con un sistema ELISA, se recomienda que el instrumento dispense primero 150  $\mu$ l de controles y calibrador, después todas las muestras y finalmente 100  $\mu$ l de conjugado diluido.

Para el paso de pre-lavado (primer punto del procedimiento del ensayo) y para las operaciones siguientes, consulte las instrucciones que aparecen debajo para el Ensayo Manual.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

**Ensayo manual:**

1. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico y hacer un ciclo de lavado para hidratar los pocillos. Identificar cuidadosamente los pocillos de controles, calibradores y muestras.

**Nota importante: El prelavado (1 ciclo: dispensación de 350 µl de solución de lavado por pocillo además de aspiración) es fundamental para obtener resultados confiables y específicos tanto en el procedimiento automático como en el manual. ¡No omitir!**

2. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
3. Dispensar 150µl del Control Negativo, por triplicado, 150µl de Calibrador por duplicado y 150 µl del Control Positivo. Posteriormente, añadir 150 µl de cada muestra.
4. Comprobar la presencia de las muestras en los pocillos a simple vista (existe una marcada diferencia de color entre los llenos y los vacíos) o por lectura a 450/620nm. (la densidad óptica de las muestras es superior a 0.100).
5. Dispensar 100 µl del Conjugado diluido en todos los pocillos, excepto en el A1 que se utiliza para operaciones de blanco.

**Nota importante:** Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.

6. Después de la adición del conjugado comprobar que las muestras han cambiado de color amarillo a rosa/rojo y después incubar la microplaca por **120 min a +37°C**.

**Notas importantes:**

- c. Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.
  - d. Si el proceso es efectuado agitando, asegúrese de tener las mismas rpm de la sección 1.3. De lo contrario se podría verificar contaminación dentro el pocillo.
7. Tras la primera incubación, lavar los pocillos como se ha descrito previamente (sección 1.4).
  8. Dispensar 200 µl de cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el A1.

**Nota importante:** No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

9. Incubar la microplaca protegida de la luz a **18-24°C durante 30 minutos**. Los pocillos con control positivo, calibrador y muestras positivas deben pasar de un tono claro a azul.
10. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática usando la misma secuencia que en el paso 8. La adición de la solución de ácido cambiará el color del control positivo, el calibrador y las muestras positivas de azul a amarillo/ marrón.
11. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección 1.6, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

**Notas generales importantes:**

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales ni polvo en el fondo externo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debería hacerse inmediatamente después de añadir la solución de ácido y, en cualquier caso, nunca transcurridos más de 20 minutos de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
3. Cuando las muestras que se van a analizar no sean seguramente limpias o hayan estado congeladas, se recomienda seguir el procedimiento abajo descrito en cuanto es menos susceptible a la interferencia de la hemólisis, hiperlipemia, contaminación bacteriana y micropartículas de fibrina. El ensayo se realiza en dos pasos a +37°C con agitación a 350 rpm ±150 como sigue:
  - a. dispensar 100 µl de controles, calibradores y muestras
  - b. incubar 60 min a +37°C con agitación
  - c. lavar según las instrucciones (sección 1.4)
  - d. dispensar 100 µl de trazador enzimático diluido
  - e. incubar 30 min a +37°C con agitación
  - f. lavar
  - g. dispensar 100 µl de mezcla TMB y H2O2
  - h. incubar 30 min a t.amb. con agitación
  - i. parar y leer
 En este procedimiento se puede omitir el prelavado. Este método muestra un rendimiento similar al método estándar por lo cual puede ser utilizado como alternativa.
4. El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

**N. ESQUEMA DEL ENSAYO.**

Operaciones	Procedimiento
Paso de pre-lavado	ciclo n° 1
Controles&Calibradores&muestras	150 µl 100 µl
Conjugado diluido	
<b>1ª incubación</b>	<b>120 min</b>
Temperatura	+37°C
Pasos de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Cromógeno/substrato	200ul
<b>2ª incubación</b>	<b>30 min</b>
Temperatura	temperatura ambiente
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

En la sección siguiente se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

**Microplaca**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M2										
B	CN	M3										
C	CN	M4										
D	CN	M5										
E	CAL	M6										
F	CAL	M7										
G	CP	M8										
H	M1	M9										

Leyenda: BL = Blanco CN = Control Negativo  
CAL = Calibrador CP = Control Positivo M = Muestra



#### O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza una comprobación en los controles/calibrador cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores DO450nm / 620-630 nm o M/Co son los esperados en el análisis.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes resultados:

Parámetro	Exigencia
Pocillo blanco	valor < 0.100 DO450nm
Control negativo (CN)	Valor medio < 0.050 de DO450nm después de leer el blanco
Calibrador 0.5 IU/ml	M/Co > 2
Control Positivo	valor > 1.000 DO450nm

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
<b>Pocillo blanco</b> > 0.100 DO450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
<b>Control negativo (CN)</b> > 0.050 DO450nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
<b>Calibrador</b> M/Co < 2	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en su distribución (por ejemplo, dispensar control negativo en lugar de calibrador) 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
<b>Control Positivo</b> < 1.000 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo. En este caso, el control negativo tendrá un valor de DO450nm > 0.050). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de comprobar, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

#### Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

#### P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE.

Los resultados de las pruebas se calculan a partir de un valor de corte determinado con la fórmula siguiente sobre el valor medio de DO450nm/620-630nm del control negativo (CN):

$$\text{CN} + 0.050 = \text{Valor de corte (Co)}$$

El valor encontrado en la prueba es utilizado para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación.

*Nota importante:* Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

#### Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre el valor de DO450nm/620-630nm de la muestra (M) y el valor de corte (Co), matemáticamente M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HBV y la unidad de sangre se puede transfundir.

Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre recogida 1 o 2 semanas después de la inicial. En este caso la unidad de la sangre no debe ser transfundida.

Un resultado positivo es indicativo de infección por HBV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente o la unidad de sangre debe ser descartada.

#### Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cualquier resultado positivo debe confirmarse antes repitiendo el ensayo sobre la muestra, después de haberla filtrado en un filtro de 0.2-0.8  $\mu$  para eliminar la interferencia de las micropartículas. Después, si todavía es positivo, la muestra debe someterse a una prueba de confirmación antes de emitir un diagnóstico de hepatitis viral.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otro departamento, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico cualificado.

A continuación se describe un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11).

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

**Control negativo:** 0.012 – 0.008 – 0.010 DO450nm  
 Valor medio: 0.010 DO450nm  
 Menor de 0.050 – Válido

**Control positivo:** 2.489 DO450nm  
 Mayor de 1.000 – Válido  
 Valor de corte = 0.010+0.050 = 0.060  
 Calibrador: 0.350 - 0.370 DO 450nm  
 Valor medio: 0.360 DO450nm M/Co = 6.0  
 M/Co Mayor de 2.0 – Válido  
 Muestra 1: 0.028 DO450nm  
 Muestra 2: 1.690 DO 450nm  
 Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa  
 Muestra 2 M/Co > 1.1 = positiva

185	Ayw2	0.5 – 1.0	<b>6,4</b>
186	Ayw3	0.5 – 1.0	<b>7,3</b>
187	Ayw3	0.5 – 1.0	<b>5,8</b>
188	Ayw4	0.5 – 1.0	<b>6,9</b>
189	Ayr	0.5 – 1.0	<b>6,1</b>
190	diluyente	/	0,6

El panel n.º 808, suministrado por Boston Biomedical Inc., Estados Unidos, también se probó para definir el límite de sensibilidad.

Los resultados en condiciones óptimas son los siguientes:

#### BBI panel PHA 808

ID muestra	Características	ng/ml	M/Co
01	ad	2,49	<b>10,2</b>
02	ad	1,17	<b>4,8</b>
03	ad	1,02	<b>4,3</b>
04	ad	0,96	<b>3,8</b>
05	ad	0,69	<b>2,9</b>
06	ad	0,50	<b>2,2</b>
07	ad	0,41	<b>1,5</b>
08	ad	0,37	<b>1,3</b>
09	ad	0,30	<b>1,2</b>
10	ad	0,23	<b>1,0</b>
11	ay	2,51	<b>11,2</b>
12	ay	1,26	<b>5,9</b>
13	ay	0,97	<b>4,1</b>
14	ay	0,77	<b>3,7</b>
15	ay	0,63	<b>2,0</b>
16	ay	0,48	<b>2,4</b>
17	ay	0,42	<b>2,0</b>
18	ay	0,33	<b>1,8</b>
19	ay	0,23	<b>1,6</b>
20	ay	0,13	<b>1,1</b>
21	negativo	/	0,6

#### R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO.

La evaluación del rendimiento ha sido realizada según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (Art. 5, Capítulo 3 de la Directiva IVD 98/79/CE). La versión ULTRA ha demostrado ser al menos equivalente al diseño original en un estudio realizado para la validación de la nueva versión.

##### 1. Sensibilidad analítica

El límite de detección del ensayo se ha calculado sobre el 2º estándar internacional O.M.S., NIBSC código 00/588.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de tres lotes (P1, P2 y P3) de la versión ULTRA en comparación con el dispositivo de referencia (Ref.):

O.M.S. IU/ml	Lote P1 M/Co	Lote P2 M/Co	Lote P3 M/Co	Ref. M/Co
0.4	<b>4.6</b>	<b>4.8</b>	<b>4.6</b>	<b>4.6</b>
0.2	<b>2.3</b>	<b>2.4</b>	<b>2.4</b>	<b>2.4</b>
0.1	<b>1.4</b>	<b>1.4</b>	<b>1.5</b>	<b>1.2</b>
0.05	0.8	0.8	<b>1.0</b>	0.7
0.025	0.6	0.6	0.6	0.4
SFB (CN)	0.3	0.2	0.3	0.1

El ensayo mostró una sensibilidad analítica mejor a 0.1 O.M.S. IU/ml de HBsAg.

Además se probaron dos paneles de sensibilidad suministrados por EFS, Francia, y por SFTS, Francia, y se obtuvieron los siguientes resultados en condiciones óptimas:

##### Panel EFS Ag HBs HB1-HB6 lote n° 04

ID muestra	Características	ng/ml	M/Co
HB1	diluyente	/	0,2
HB2	adw2+ayw3	0.05	0,6
HB3	adw2+ayw3	0.1	<b>1,0</b>
HB4	adw2+ayw3	0.2	<b>1,8</b>
HB5	adw2+ayw3	0.3	<b>2,4</b>
HB6	adw2+ayw3	0.5	<b>4,2</b>

##### Panel de sensibilidad SFTS, Francia, Ag HBs 2005

ID muestra	Características	ng/ml	M/Co
171	Adw2 + ayw3	2.21 ± 0.15	<b>15,4</b>
172	Adw2 + ayw3	1.18 ± 0.10	<b>8,7</b>
173	Adw2 + ayw3	1.02 ± 0.05	<b>6,1</b>
174	Adw2 + ayw3	0.64 ± 0.04	<b>4,0</b>
175	Adw2 + ayw3	0.49 ± 0.03	<b>3,4</b>
176	Adw2 + ayw3	0.39 ± 0.02	<b>2,6</b>
177	Adw2 + ayw3	0.25 ± 0.02	<b>2,0</b>
178	Adw2 + ayw3	0.11 ± 0.02	<b>1,3</b>
179	Adw2 + ayw3	0.06 ± 0.01	<b>0,9</b>
180	Adw2 + ayw3	0.03 ± 0.01	0,8
181	Adw2	0.5 – 1.0	<b>4,7</b>
182	Adw4	0.5 – 1.0	<b>3,6</b>
183	Adr	0.5 – 1.0	<b>4,5</b>
184	Ayw1	0.5 – 1.0	<b>5,1</b>

##### 2. Sensibilidad Diagnóstica:

La sensibilidad diagnóstica ha sido probada según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) de la Directiva 98/79/CE en IVD para pruebas HBsAg.

Las muestras positivas, incluidos los subtipos de HBsAg y un panel de mutantes "s" de las mutaciones más frecuentes, se recogieron de distintas patologías de HBV (hepatitis B aguda, asintomática y crónica) o producidas sintéticamente, y se detectaron positivas en el ensayo.

Todos los subtipos conocidos de HBsAg, "ay" y "ad", y los isoformas "w" y "r", suministrados por CNTS, Francia, se probaron en el ensayo y el equipo los determinó positivos según lo previsto.

Se ha hallado un valor global de 100% en un estudio realizado sobre un número total de más de 400 muestras positivas con la referencia original IVD código SAG1.CE, marca CE.

Se estudiaron 30 sero-conversiones en total, la mayoría producidas por Boston Biomedica Inc., EE.UU.

Los resultados obtenidos al examinar ocho paneles suministrados por Boston Biomedica Inc., EE.UU., se indican abajo para la versión ULTRA en comparación con el dispositivo de referencia código SAG1.CE.

Panel ID	1ª muestra positiva	HBsAg subtipo	HBsAg ng/ml	Versión ULTRA M/Co	Ref. dispositivo M/Co
PHM 906	02	ad	0.5	<b>3,7</b>	<b>1,4</b>
PHM 907 (M)	06	ay	1.0	<b>4,4</b>	<b>2,9</b>
PHM 909	04	ad	0.3	<b>1,2</b>	0,8
PHM 914	04	ad	0.5	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>
PHM 918	02	ad	0.1	<b>1,8</b>	0,5
PHM 923	03	ay	< 0.2	<b>2,2</b>	<b>1,2</b>
PHM 925	03	Ind.	n.d.	<b>1,4</b>	0,9
PHM 934	01	ad	n.d.	<b>1,0</b>	0,8

### 3. Especificidad Diagnóstica:

Se define como la probabilidad del ensayo de detectar negativos en ausencia del analito específico. Además del primer estudio, donde se examinaron más de 5000 muestras negativas de donantes de sangre (dos centros de donación) clasificadas como negativas con un dispositivo con marca CE en uso en el laboratorio de recogida, la especificidad diagnóstica se evaluó recientemente examinando un total de 2288 muestras de donantes de sangre negativas en siete lotes distintos. Se observó un valor de especificidad de 100%.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humanos para determinar la especificidad.

No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Las muestras congeladas también se han probado para comprobar si la congelación interfiere con el rendimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

Se examinaron muestras procedentes de pacientes afectados por hepatitis víricas (HCV, HVA) y patologías no víricas del hígado, que pudieran provocar interferencia en el ensayo. No se detectó reacción cruzada.

### 4. Precisión:

Ha sido calculada para la versión ULTRA en dos muestras examinadas en 16 réplicas en 3 series diferentes para tres lotes.

Los resultados se indican en la siguiente tabla:

Valores promedio Total n = 144	Negativo Muestra	Calibrador 0.5 IU/ml
DO450nm	0.026	0.332
Desviación estándar	0.004	0.027
CV %	16%	8%

La variabilidad mostrada en las tablas no dio como resultado una clasificación errónea de las muestras.

### S. LIMITACIONES.

Se evaluaron resultados falso positivo repetibles en muestras recién recogidas en menos del 0.1% de la población normal, debido principalmente a altos títulos de anticuerpo anti ratón heterofílicos (HAMA).

También se observaron interferencias en muestras frescas cuando no estaban libres de partículas o se recogieron incorrectamente (ver capítulo G).

Las muestras antiguas o congeladas, con coágulos de fibrina, crioglobulinas, micelas que contienen lípidos o micropartículas después de almacenar o descongelar, pueden generar falsos positivos.

### BIBLIOGRAFÍA.

1. Aach R.D., Grisham J.W., Parker S.W.. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc.Natl.Acad.Sci..USA, 68:1956, 1971.
2. Blumer B.S., Suinick A.I., London W.T.. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. Bull.N.Y.Acad.Med.. 44:1566, 1968.
3. Boniolo A., DAVIS M., Matteja R.. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies against hepatitis B surface antigen. J.Immunol.Meth.. 49:1, 1982.
4. Caldwell C.W., Barpet J.T.. Enzyme immunoassay for hepatitis B and its comparison to other methods. Cli.Chim.Acta 81: 305, 1977
5. Fazekas S., De St.Groth, Scheidegger D.. production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Meth.. 35: 1, 1980
6. Reesink H.W.. et al.. Comparison of six 3<sup>rd</sup> generation tests for the detection of HBsAg. Vox.Sang.. 39:61, 1980
7. Rook G.A.W.. Chromogens for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using horseradish peroxidase. Lepr.Rev. 52: 281, 1981
8. Schroder J.. Monoclonal antibodies: a new tool for reasearch and immunodiagnostic. Med.Biol.. 58: 281, 1981
9. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. J.Med.Virol. 1999;59(1):19-24

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (Mi) – Italia

**CE**  
0318

