



CE
0344

HBsAg Elisa

KAPG4SGE3/KAPG4SGE11

History

Summary of change :

Previous Version : 190318/1	Current Version : 200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "




HBsAg Elisa

en

For in-vitro qualitative detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in human serum or plasma.

KAPG4SGE3 : 96 tests / KAPG4SGE11 : 480 tests

IN VITRO DIAGNOSTIC USE **IVD**

 DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium
Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) INTENDED USE

HBsAg Elisa is an enzyme immunoassay diagnostic kit for in-vitro qualitative detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in human serum or plasma (heparin, citrate or EDTA).

2) SUMMARY AND TEST EXPLANATION

The hepatitis B surface antigen (HBsAg) is the first marker that appears in the blood following infection with hepatitis B virus (HBV) some days or weeks before clinical symptoms manifest. It is a lipoprotein polypeptide which constitutes the external envelope of the HB virus. The detection of HBsAg in human serum or plasma indicates an ongoing HBV infection, either acute or chronic. Testing of additional HBV markers is needed to define the specific disease state. HBsAg assays are used not only to diagnose HBV infections but also to monitor the course of the disease and the efficacy of antiviral therapy.

HBsAg Elisa is a fast test for the qualitative detection of the presence of HBsAg in serum or plasma (heparin, citrate or EDTA) specimen. The test utilizes monoclonal and polyclonal (anti-guinea pig) antibodies to selectively detect elevated levels of HBsAg in serum or plasma.

Specimens which are non-reactive by **HBsAg Elisa** are considered negative for HBsAg. Specimens with positive reaction should be retested in duplicate.

In case of a reactive repeat reaction, the specimen should be confirmed for HBsAg reactivity with validated confirmatory reagents .

Only confirmed positive specimens are considered to contain HBsAg.

3) TEST DESCRIPTION

HBsAg Elisa is a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA= enzyme-linked immuno-sorbent assay) based on the "sandwich principle".

The solid phase of the microtiter plate is made of polystyrene wells coated with mouse monoclonal antibodies specific for HBsAg; whereas guinea pig polyclonal antibody purified by affinity chromatography is used to prepare the anti-HBs•peroxidase (horseradish) conjugate in the liquid-phase.

When a serum or plasma specimen containing HBsAg is added to the anti-HBs antibody-coated wells together with the peroxidase conjugated anti-HBs antibody and incubated, an antibody-HBsAg-antibody-peroxidase complex will form on the wells.

After washing the microtiter plate to remove unbound material, a solution of TMB substrate is added to the wells and incubated. A color develops in proportion to the amount of HBsAg bound to Anti-HBs. The peroxidase-TMB reaction is stopped by addition of sulfuric acid. The optical density of developed color is read with a suitable photometer at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm*¹.

The test principle is shown also in the following figure.

A Specimen containing HBsAg:


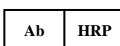



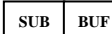

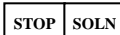
1. Plate well (Anti-HBs) + specimen (HBsAg)+ Anti-HBs•peroxidase → Anti-HBs•HBsAg•(Anti-HBs•peroxidase) sandwich complex
2. Sandwich complex + TMB substrate solution → Light blue to blue color
3. Add sulfuric acid to stop the color development → Read OD at 450nm (reference wavelength 620-690 nm*¹)

B Specimen without HBsAg:

1. Plate well (Anti-HBs) + specimen (no HBsAg) + Anti-HBs•peroxidase → Anti-HBs (on the well)
2. Anti-HBs (on the well) + TMB substrate solution → Colorless to light blue color
3. Add sulfuric acid to stop the color development → Read OD at 450nm (reference wavelength 620-690 nm^{*1})

4) DESCRIPTION OF MATERIALS PROVIDED

- Item 1 - 6 in the following reagent table should be refrigerated at 2-8°C . Washing Solution D (20X) and stop solution can be stored at 2-30°C.

ITE MS	Components	Description	Qt. per 96 tests	Qt. per 480 tests
(1)	Anti-HBs Plate 	Microtiter plate coated with mouse monoclonal anti-HBs.	1 plate	5 plates
(2)	Anti-HBs Peroxidase Solution 	Polyclonal Anti-HBs HRPO conjugate, diluted in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal. Dye: phenol red.	1 bottle, 8 ml	1 bottle, 25 ml
(3)	HBsAg Positive Control 	Inactivated human serum positive for HBsAg but non-reactive for anti-HCV and anti-HIV1/2, diluted in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 1.5 ml	1 bottle, 3 ml
(4)	HB Negative Control 	Serum non-reactive for HBV markers, anti-HCV and anti-HIV1/2, diluted in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 2 ml	1 bottle, 3 ml
(5)	Chromogenic TMB concentrate 	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base.	1 bottle, 12 ml	1 bottle, 35 ml
(6)	Substrate buffer 	Acetic Acid Buffer with Urea Hydrogen Peroxydase.	1 bottle, 12 ml	1 bottle, 35 ml
(7)	Conc. Washing Solution (20X) 	Concentrated Phosphate buffer with Tween-20	1 bottle, 58 ml	1 bottle, 250ml
(8)	Stop Solution 	2N sulfuric acid	1 bottle, 12 ml	1 bottle, 50 ml

- OTHER REQUIRED MATERIALS, BUT NOT PROVIDED




ITEMS	Components
(1)	50µl, 100µl micropipettes and tips are needed
(2)	Water bath or incubator with temperature control at +37°C.
(3)	Plate washing equipment.
(4)	ELISA Microwell Reader: Dual wavelength 450nm with 620-690nm as reference wavelength, bandwidth 10nm ^{*1} .
(5)	Fully automatic EIA micro-plate analyzer is optional. User should validate the automatic EIA micro-plate analyzer in combination with the kit.

4.1) Storage condition and Stability of the kit and components

Kit/components	Storage temp.	State	Stability
HBsAg Elisa KIT	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
HBsAg Positive Control	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
HB Negative Control	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
Anti-HBs Plate	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
Anti-HBs • HRPO Conjugate Solution	+2 to +8°C	Original	18 months
		Once open	1 month
Concentrated Washing Solution (20X)	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month
20X Diluted Washing Solution	Room temp.	Diluted	2 days
	+2 to +8°C	Diluted	1 week
Chromogenic TMB concentrate	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
Substrate buffer	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
TMB substrate mixture	Room temp.	Mixture	6 hours
2N Sulfuric Acid	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month

5) Instructions for Use

5.1) Warnings:

- 5.1.1) This reagent kit is for professional use only.
- 5.1.2) **IVD** This reagent kit is for *in vitro* diagnosis only.
- 5.1.3) Bring all kit reagents and samples to room temperature (+20 to +30°C) and mix carefully before use.
- 5.1.4) Do not use reagent beyond its expiration date.
- 5.1.5) Do not interchange reagents between different lots.
- 5.1.6) Do not put pipette in mouth.
- 5.1.7) Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.
- 5.1.8) All kit components and specimens should be regarded as potential health hazards. It should be used and discarded according to your laboratory's safety procedures. Such safety procedures probably include the wearing of protective gloves and avoiding the use of aerosols.
- 5.1.9) Potential infectious specimens and non-acid containing spills or leakages should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite or treated in accordance with your practice for potential bio-hazard control.
- 5.1.10) Prior to disposing used specimens and kit reagents as general waste; it should be treated in accordance with the local practice of potential bio-hazardous waste or treated as follows:
Both liquid and solid waste should be autoclaved at +121°C for at least 30 minutes.
Solid waste can also be incinerated.
Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%.
Acidic liquid wastes must be neutralized before treatment with sodium hypochlorite as mentioned above and should stand for 30 minutes to obtain effective disinfection.
- 5.1.11)  Stop Solution is an irritant to skin, eyes, respiratory tract and mucous membranes. Avoid contact of the stop solution with skin and mucous membranes. In case of contact, flush immediately with abundant amounts of water. In case of inhalation, find fresh air and seek medical attention in case of pain.
- 5.1.12)   Chromogenic TMB concentrate contains organic solvent, which is flammable : danger of serious irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed. Chromogenic TMB concentrate contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes.



- 5.1.13) Although all human sourced material are tested non reactive for Anti-HCV and Anti-HIV, and inactivated at +56°C for one hour, the reagent shall be handled as potential infectious material.*²

5.2) Residual risks

- 5.2.1) Incorrect operation could lead to wrong results.
- 5.2.2) Using the kit after expiration date might lead to wrong results.
- 5.2.3) Inefficient Washer and ELISA Reader could affect the final result.
- 5.2.4) Storage at higher temperature could affect the shelf life of the product.
- 5.2.5) The product is for single use only. Reuse could lead to wrong results.
- 5.2.6) Any change to the test procedure may lead to incorrect results which could cause diagnostic error.

5.3) Specimen Collection and Preparation for Analysis

- 5.3.1) No special preparation of the patient is required prior to blood collection. Blood should be collected by approved medical techniques.
- 5.3.2) Either serum or plasma specimens can be used with this test kit. Whole blood specimen should be separated as soon as possible in order to avoid hemolysis. Any particulates (e.g. fibrin clots, erythrocytes) contained in the specimen should be removed prior to use.
- 5.3.3) Specimens must be stored at +2 to +8°C and avoid heat-inactivation to minimize deterioration. For long-term storage, they should be frozen below -20°C. Storage in self-defrosting freezer is not recommended.
- 5.3.4) Frozen specimens must be thoroughly thawed and mixed homogenously before test.
- 5.3.5) Avoid multiple freeze-thaw procedures.

WARNING

- 1. The specimen must not contain any compounds of AZIDE, which inhibits the peroxidase activity.
- 2. Incompletely coagulated sera and microbial-contaminated specimens should not be used.

5.4) Storage conditions and Stability of Reagents

- 5.4.1) The kit must be stored at +2 to +8°C. Do not freeze.
- 5.4.2) Strips of the plate should be used within one month after opening the original aluminum foil bag. The unused strips should be kept in the aluminum foil bag and taped tightly.
- 5.4.3) Return reagents to +2 to +8°C immediately after use.
- 5.4.4) Washing Solution (20X) Concentrate can be stored at room temperature to avoid crystallization, because the kits are stored and shipped at +2 to +8°C. If crystals have been precipitated before use, warm up the solution at 37°C in a water bath until the crystals dissolve.

5.5) Plate Washing Procedure

- 5.5.1) Preparation of washing solution:
Dilute Washing Solution (20X) Concentrate with distilled or de-ionized water to obtain a 1:20 dilution. Do not use tap water.
- 5.5.2) Plate washing:
 - (a) For plate washer with overflow aspirating function: 6 cycles with at least 0.5 ml washing buffer per well per cycle.
 - or
 - (b) For plate washer without overflow aspirating function: 8 cycles with at least 0.35 ml washing buffer per well per cycle.
- 5.5.3) Blot dry by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. Too much residual wash buffer will cause false results.

WARNING : Improper washing will cause false results.

5.6) Test Procedure

5.6.1) Bring all reagents and specimens to room temperature (+20 to +30°C) before assay. Adjust water bath or incubator to +37±1°C.

5.6.2) Reserve one well for blank. Add 50 µl of each control or specimen to appropriate wells of the microtiter plate (3 Negative Controls and 2 Positive Controls).

NOTE:

- a. Use a clean pipette tip for each sampling to avoid cross-contamination.
- b. Each plate needs respective negative controls, positive controls and blank well.
- c. Do not use any cut-off value established for other plates of HBsAg Elisa.

5.6.3) Add 50 µl of Anti-HBs Peroxidase Solution to each well except the blank.

NOTE: Do not touch the wall of the plate wells to prevent contamination.

5.6.4) Gently tap the plate.

5.6.5) Remove the protective backing from the Adhesive Slip and press it onto the reaction plate, so that it is tightly sealed.

5.6.6) Incubate the reaction plate at +37±1°C in a water bath or incubator for **80 minutes**.

5.6.7) At the end of the incubation period, remove and discard the Adhesive Slip and wash the plate in accordance with 5.4) Plate Washing Procedure.

5.6.8) Select one of the following two methods for color development:

- A. Mix equal volumes of **Chromogenic TMB concentrate and Substrate Buffer** in a clean container immediately prior to use. Add **100 µl** of the mixture solution to each well including the blank well.
- B. Add **50µl** of **Chromogenic TMB concentrate** first, and then add **50 µl** of **Substrate buffer** into each well including the blank. Mix well carefully.

NOTE: Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue; otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer should be used within 6 hours after mix. The mixture should be kept away from intense light.

5.6.9) Cover the plate with a black cover and incubate at **room temperature** for **30 minutes**.

5.6.10) Stop the reaction by adding **100 µl** of stop solution to each well including the blank.

5.6.11) Determine the absorbance of Controls and test specimens within 30 minutes with a precision spectrophotometer at 450/620-690nm (450nm reading wavelength with 620 – 690 nm reference wavelength) *1.

Use the blank well to blank spectrophotometer.

NOTE: The color of the blank should be colorless to light yellow; otherwise, the test results are invalid.
Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100.

5.7) Calculations of Results

5.7.1) Calculation of the NC (Mean Absorbance of Negative Control).

Example: Sample No.	Absorbance
1	0.022
2	0.025
3	0.023

$$NC = (0.022 + 0.025 + 0.023) / 3 = 0.023$$

NCx should be ≤0.1, otherwise, the test is invalid.

5.7.2) Calculation of the PC (Mean Absorbance of Positive Control)

Example: Sample No.	Absorbance
1	1.432
2	1.508

$$PC = (1.432 + 1.508) / 2 = 1.470$$

PC should be ≥0.6, otherwise, the test is invalid.

5.7.3) Calculation of the **P - N Value**

$$P - N = PC - NC$$

Example: NC = 0.024

PC = 1.470

$$P - N = 1.470 - 0.024 = 1.446$$

P - N Value must be ≥0.5, otherwise, the test is invalid.

5.7.4) Calculation of the Cutoff Value

$$\text{Cutoff Value} = NC + 0.025$$

Example:

$$\text{Cutoff Value} = 0.023 + 0.025 = 0.048$$

5.8) Validity of Test Runs

5.8.1) NC should be ≤ 0.1 ; otherwise, the test is invalid.

5.8.2) PC should be ≥ 0.6 , otherwise, the test is invalid.

5.8.3) P - N Value must be ≥ 0.5 , otherwise, the test is invalid.

NOTE: Negative Control: absorbance value must be less than or equal to 0.100 after subtracting the blank.

5.9) Interpretation of Results

5.9.1) Specimens with absorbance values **LESS** than the **Cutoff Value** are **NON-REACTIVE** and are considered **NEGATIVE for HBsAg**.

5.9.2) Specimens with absorbance value **GREATER** than or **EQUAL** to the **Cutoff Value** are considered **INITIALLY REACTIVE**. The original specimens must be retested in duplicate.

5.9.3) If both absorbance values in the retest are **less** than the cutoff value, the specimens are considered **NEGATIVE for HBsAg**.

If in the retest at least one of the two absorbance values is **GREATER** than or **EQUAL** to the **Cutoff Value** then the specimens are considered as **repeated HBsAg positive**. The repeated positive specimen shall be confirmed with Antisurgen B.

5.10) Troubleshooting

If the result cannot be reproduced, perform a preliminary troubleshooting by checking the possibilities listed below:

5.10.1) Improper washing procedure.

5.10.2) Contamination with positive specimen.

5.10.3) Wrong volume of sample, conjugate or substrates.

5.10.4) Contamination of the well rim with conjugate.

5.10.5) Improper specimen, such as hemolyzed serum or plasma, specimen containing sediments and specimen not thoroughly mixed before use.

5.10.6) Wrong incubation time or temperature.

5.10.7) Obstructed or partial obstructed washer aspirate/dispense head and needles.

5.10.8) Insufficient aspiration.

5.11) Limitations and Interferences

5.11.1) This reagent kit is to be used for un-pooled human serum or plasma only.

5.11.2) The reagent kit has not been validated for use with cadaveric samples.

5.11.3) A negative HBsAg result without other evidence should not be used to exclude an HBV infection.

5.11.4) Interfering Substances:

The following results were obtained in respective experiments:

1. No interferences with different anticoagulants such as lithium heparin, EDTA, citrate have been observed.

2. Heat-treated specimens (+60°C, 10 hours) exhibited diminished HBsAg titer.

3. No cross reactivity was detected using specimens deriving from patients with a) other infections by HAV, EBV, CMV, HSV, VZV, Lyme Borreliosis, HCV, HIV, b) other disease states such as chronic renal failure, hemodialysis, autoimmune hepatitis, liver cirrhosis, and c) presence of certain antibodies like HAMA, GAD, IA2, APS).

4. Samples containing potential interfering substances [e.g. triglycerides (lipemia), hemoglobin (hemolysis), bilirubin (icterus), monoclonal immunoglobulin components, elevated levels of autoimmune antibodies (rheumatoid factor-RF, antinuclear antibodies-ANA, or antimitochondrial antibodies-AMA)] and samples from pregnant women did not interfere with the HBsAg Elisa assay.

5.12) Performance Characteristics

5.12.1) Diagnostic Specificity

Results from the European Performance Evaluation for DIAsource HBsAg Elisa - Reactivity of HBV Negative "Donor" and "Clinical" Specimens.

Total No. of Specimens	DIAsource HBsAg Elisa					
	N	Neg	*IR	**RR	Confirmed	False Positive
HBV negative (clinical specimen)	213	211	2	2	0	2
HBV negative (donor specimen)	5501	5479	22	22	0	22
Total	5714	5690	24	24	0	24

*IR: initial reactive **RR: repeat reactive

Diagnostic specificity = $5690/5714 = 99.58\%$

5.12.2) Diagnostic Sensitivity

1. The diagnostic sensitivity determined in the European performance evaluations yielded the following results:

Sample	No. of sample	Reactive	Sensitivity
HBsAg positive sera	400	400	100%

Diagnostic sensitivity = $400/400 = 100\%$

2. The evaluation of the HBsAg Sensitivity Panel PHA807 (BBI, USA) yielded the following results:

Panel	No. of panel members	Results
BBI HBsAg Sensitivity Panel PHA807	PHA807-01 ~ 21	Equivalent to or better than the competitors.

3. The evaluation of the HBsAg Mixed Titer Performance Panel PHA205 (BBI, USA) yielded the following results:

Panel	No. of panel members	Results
BBI HBsAg Mixed Titer Performance Panel PHA205	PHA205-01 ~ 25	Equivalent to or better than the competitors.

4. The HBsAg Mixed Titer Performance Panel VHA601 (BBI, USA) evaluation yielded the following results:

Panel	No. of panel members	Results
BBI HBsAg Mixed Titer Performance Panel VHA601	VHA601-01 ~ 06	Met BBI's expected results.

5. The evaluation of the HBsAg Mixed Titer Performance Panel QHA711 (BBI, USA) yielded the following results:

Panel	No. of panel members	Results
BBI HBsAg Mixed Titer Performance Panel QHA711	QHA711-01 ~ 06	Met BBI's expected results.

6. INTS HBsAg Subtype Panel Test Result:

The results of the evaluation demonstrate that all known HBsAg serotypes (HBsAg subtypes) available in the INTS HBsAg subtype panel can be detected by both HBsAg Elisa and the reference assay up to $10^4x \sim 10^6x$ dilutions.

7. Summary table of the evaluation of all tested seroconversion panels:

PPanel ID	HBsAg Positive Result From Date of First Blood Collection			
	Reference HBsAg Assay (A in days)	HBsAg Elisa (B in days)	Difference in Bleed Days (A-B)	Difference in Bleed #s (panel member No.)
PHM907(ay)	50	50	0	0
PHM916(ay)	62	65	-3	-1
PHM920(ad)	26	26	0	0
PHM921(ad)	0	0	0	0
PHM930(ad)	3	3	0	0
PHM933(ad)	7	9	-2	-1
PHM934(ad)	0	0	0	0

PHM935A (ad)	9	21	-12	-3
PHM935B (ad)	231	217	14	-1
NabiSB0411	6	6	0	0
PHM903(ad)	6	10	-4	-1
PHM904(ad)	7	18	-11	-1
PHM906(ad)	137	0	137	1
PHM909(ad)	9	9	0	0
PHM910(ad)	35	18	17	1
PHM912(ad)	42	0	42	7
PHM914(ad)	0	146	-146	-1
PHM915(ind)	12	28	-16	-5
PHM917(ind)	36	>43	->7	->2
PHM918 (ad)	7	7	0	0
PHM923 (ay)	15	21	-6	-1
PHM924 (ad)	29	35	6	1
PHM925(ind)	8	14	-6	-1
PHM926(ind)	13	15	-2	-1
PHM927(ind)	4	7	-3	-1
PHM928 (ad)	9	9	0	0
PHM929 (ad)	14	18	-2	-1
PHM931(ind)	19	21	-2	-1
PHM932 (ad)	61	61	0	0
PHM935A (ad)	21	28	-7	-2
Over all	-----	-----	Sum = -13	-----
		Average	-13/30 = 0.4 days	-----

Summary of the evaluation of all tested seroconversion panels:

The results have shown that the HBsAg Elisa is nearly equivalent to the reference assay. On average the HBsAg Elisa test is only 0.4 days later in the 30 tested seroconversion panels in comparison to the reference assay.

5.12.3) Mutants

1. Mutant Panel

A Hepatitis B Pre Core Mutant panel of Teragenix, USA was tested. HBsAg Elisa can detect the results while panel's dilution ratio is 1:2 or 1:5.

This panel consists of 3 samples Core Promoter (A1762/G1764) wild type; PreCore codon 28 mutant/wild type infection, of 4 samples Core Promotor (A1762/G1764) wild type; PreCore codon 28 mutant, of 2 samples Core Promotor (T1762/A1754) MUTANT/(A1762/G1754) wild type mixed infection.

2. Mutant samples

The detection rate of HBsAg Elisa is 17/21 which is better than reference kit's (14/21).

Mutation	HbsAg Elisa	Reference kit	Mutation	HbsAg Elisa	Reference kit
	Int	Int		Int	Int
113A114	positive	positive	C137W	positive	negative
P120L	positive	positive	C139Y	positive	positive
R122I	negative	negative	K141E	positive	positive
R122T	positive	positive	P142L/G145R	negative	negative
E122I	positive	positive	P142L	positive	positive
T123N	positive	positive	D144G	positive	negative
122RA123	negative	negative	G145K	positive	negative
C124R	negative	negative	C147T/C148T	positive	positive
T131I	positive	positive	E164D	positive	positive
T131P	positive	positive	S174N	positive	positive
Y134S	positive	positive			

Mutation	HbsAg Elisa	Reference kit	Mutation	HbsAg Elisa	Reference kit
Detection Rate	8/11	8/11	Detection Rate	9/10	6/10

5.12.4) 25 same day fresh positive samples

HBsAg Elisa detected 25 same day fresh positive samples. The criteria of the chapter 3.1.9 of the 2009/886/EC was fulfilled.

5.12.5) Analytical Sensitivity

Standard Material	Calculated Sensitivity
WHO 2 nd international Standard ^{**}	0.03 IU/mL
PEI standard Subtype ad	0.08 PEI U/mL
PEI standard Subtype ay	0.09 PEI U/mL

^{**} WHO Second International Standards for HBsAg, subtype adw2, genotype A, NIBSC code: 00/588

5.12.6) Precision

1. Intra-assay reproducibility

Intra-assay precision was determined using one positive control sample and two patient serum samples of different HBsAg concentration (slightly above the cutoff level and at medium level) which were analyzed in replicates of 20 in a single run over 3 days.

Run	Sample ID	Mean	Standard Deviation	Coefficient of Variation
1	PC 1 :32	0.7541	0.0857	11.36
1	PS 1 :32	2.2766	0.1571	6.90
1	PS 1 :64	1.3159	0.1168	8.88
2	PC 1 :32	0.9671	0.0358	3.70
2	PS 1 :32	2.7325	0.1025	3.75
2	PS 1 :64	1.5822	0.0888	5.61
3	PC 1 :32	0.9669	0.0909	9.40
3	PS 1 :32	2.6088	0.2367	9.07
3	PS 1 :64	1.6502	0.1499	9.08

The calculated CV's ranged between 3.7 % and 11.36 %. (= acceptable value for an immunoassay in microtiter plate format).

2. Inter-assay reproducibility

The precision evaluation experiments were performed over 10 operating days is using five serum samples (with borderline positive and clearly above cutoff value HBsAg levels).

Sample ID	N	Mean	Standard Deviation	Coefficient of Variation
F1	10	0.0609	0.0185	30.41
F2	10	0.0770	0.0189	24.56
F3	10	0.1000	0.0245	24.51
F4	10	0.1786	0.0462	25.87
F5	10	0.6107	0.1412	23.12

The calculated CV's ranges between 30.4 for an HBsAg negative sample and 23.1 % for an HBsAg low positive sample (= acceptable values for the inter-assay imprecision of an immunoassay in microtiter plate format).

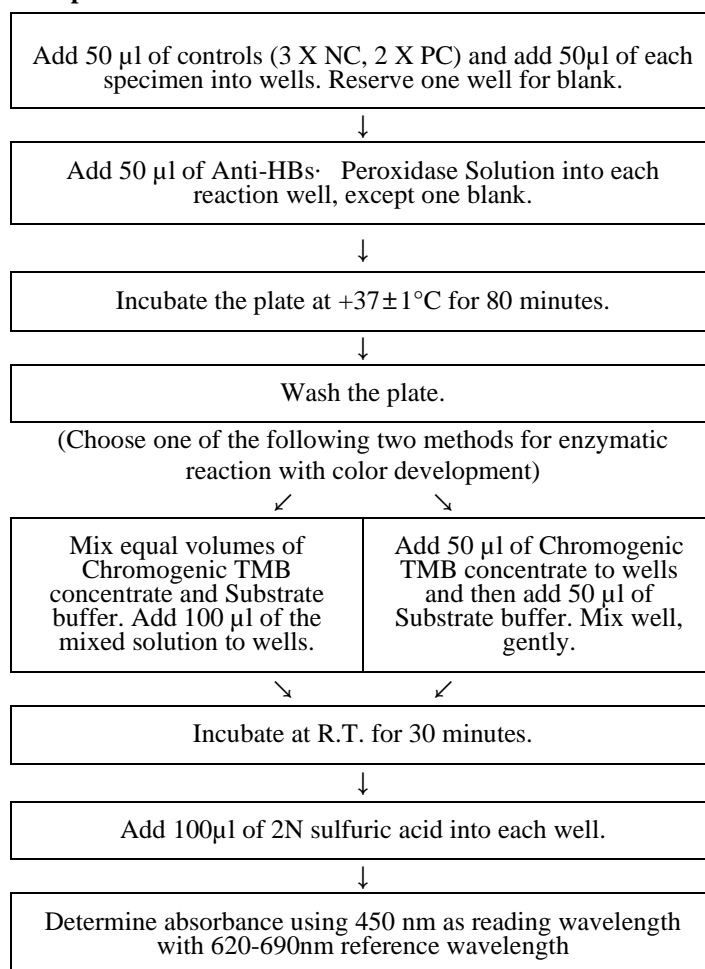
5.12.7) Antigen Excess/High-dose hook effect

This was performed testing a serum sample with a very high HBsAg concentration of 125 mg/L in serial dilution with the DIAsource HBsAg Elisa assay. No high-dose hook effect was observed.

5.12.8) Traceability

The DIAsource HBsAg Master Calibrator has been calibrated against the British Working Standard for HBsAg (NIBSC-Code: 01/476-006) using the **HBsAg Elisa** assay. The relative potency (ratio) of the British Working Standard for HBsAg versus the DIAsource HBsAg Master Calibrator is 4.081 (3.853-4.325 95% CI). The concentration of the Positive Control of **HBsAg Elisa** assay has been determined against the DIAsource HBsAg Master Calibrator and was established with 42 IU/ml \pm 20%.

5.13) Flow chart of the test procedure



6) NOTES

- *1 The reference wavelength of the photometer to be used can be 620 nm to 690 nm. However, the user should validate the photometer in combination with **HBsAg Elisa** before use.
- *2 Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at +60°C for 10 hours, J. Infect. Dis. 138:242-244.

7) BIBLIOGRAPHY

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A „new“ antigen in leukemia sera. JAMA, 1965;191:101- 106.
2. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970; 1: 695 - 698.
3. Aach RD, G ham JW, Paker CW. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc Natl Acad Sci. USA 1971;68:1056-1060.
4. Kim CY, Tikes JG. Purification and biophysical characterization of hepatitis antigen. J Clin Invest. 1973; 52:1176-1186.
5. Wolters G. Kuijpers LP, Kacaki J, Schuurs AH, Enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen. J Infect. Dis 1977;136:Suppl 311-377.
6. Shih JW, Cote PJ Jr, Dapolito GM, Gerin JL. Production of monoclonal antibodies against hepatitis B surface antigen (HBsAg) by somatic cell hybrids. J Virol Methods. 1980;1:257-273.
7. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Semin Liver Dis. 1991;11:73-83

Revision date : 2020-02-24

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website:
<https://www.diasource-diagnostics.com/>



HBsAg Elisa

fr

Pour la détection qualitative in vitro de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) dans le sérum ou le plasma humain.

KAPG4SGE3 : 96 tests / KAPG4SGE11 : 480 tests

DIAGNOSTIC IN VITRO



DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique
Tél. : +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) BUT DU DOSAGE

L'**HBsAg Elisa** est un kit de diagnostic d'essai immuno-enzymatique pour la détection qualitative in vitro de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) dans le sérum ou le plasma humain (hépariné, citraté ou sur EDTA).

2) RESUME ET EXPLICATION DU TEST

L'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) est le premier marqueur qui apparaît dans le sang suite à une infection par le virus de l'hépatite B (HBV) quelques jours ou semaines avant la manifestation des symptômes cliniques. Il s'agit d'un polypeptide lipoprotéique qui constitue l'enveloppe externe du virus HB. La détection de l'HBsAg dans le sérum ou le plasma humain indique une infection par l'HBV en cours, aiguë ou chronique. La recherche de marqueurs HBV supplémentaires est nécessaire pour définir le stade précis de la pathologie. Les essais HBsAg sont utilisés non seulement pour diagnostiquer les infections par l'HBV, mais également pour surveiller la progression de la pathologie et l'efficacité du traitement antiviral.

L'**HBsAg Elisa** est un test rapide servant à la détection qualitative de la présence de l'HBsAg dans un échantillon de sérum ou de plasma (hépariné, citraté ou sur EDTA). Ce test utilise des anticorps monoclonaux et polyclonaux (cochons d'Inde) afin de détecter de façon sélective des niveaux élevés d'HBsAg dans le sérum ou le plasma.

Les échantillons qui ne réagissent pas à l'**HBsAg Elisa** sont considérés comme négatifs pour l'HBsAg. Les échantillons qui réagissent doivent être testés à nouveau en doublon.

Si la réaction positive se répète, la réactivité pour l'HBsAg de l'échantillon doit être confirmée par des réactifs de confirmation validés.

Seuls les échantillons positifs confirmés sont considéré contenir de l'HBsAg.

3) DESCRIPTION DU TEST

L'**HBsAg Elisa** est un essai immuno-enzymatique en phase solide (ELISA = enzyme-linked immuno-sorbent assay) basé sur le « principe du sandwich ».

La phase solide de la plaque de microtitration est composée de puits en polystyrène tapissés d'anticorps monoclonaux de souris spécifiques de l'HBsAg ; par ailleurs, un anticorps polyclonal de cochon d'Inde purifié par chromatographie d'affinité est utilisé pour préparer le conjugué anti-HBs• peroxydase (de raifort) dans la phase liquide.

Lorsqu'un échantillon de sérum ou de plasma contenant des HBsAg est ajouté avec l'anticorps anti-HBs conjugué contenant de la peroxydase aux puits tapissés d'anticorps anti-HBs et incubé, un complexe anticorps-HBsAg-anticorps-peroxydase se forme sur les puits.

Après lavage de la plaque de microtitration pour éliminer le matériel non lié, une solution du substrat TMB est ajoutée aux puits et la plaque est incubée. Une couleur apparaît, proportionnelle à la quantité d'HBsAg liés aux anti-HBs. La réaction peroxydase-TMB est stoppée par ajout d'acide sulfurique. La densité optique de la couleur développée est lue à 450 nm à l'aide d'un photomètre adapté avec une longueur de référence comprise entre 620 et 690 nm^{*1}.

Le principe du test est également décrit ci-dessous.

A Échantillon contenant de l'HBsAg :

1. Puits d'une plaque (Anti-HBs) + échantillon (HBsAg) + Anti-HBs•peroxydase → complexe sandwich anti-HBs•HBsAg•(Anti-HBs•peroxydase)
2. Complexe sandwich + solution du substrat TMB → coloration bleu clair à bleu
3. Ajouter de l'acide sulfurique pour arrêter la coloration → Lire la DO à 450 nm (longueur d'onde de référence entre 620 et 690 nm^{*1})






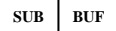
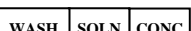
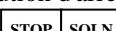
B Échantillon sans HBsAg :

1. Puits d'une plaque (Anti-HBs) + échantillon (sans HBsAg) + Anti-HBs•peroxydase → Anti-HBs (sur le puits)

2. Anti-HBs (sur les puits) + solution du substrat TMB → couleur incolore à bleu clair
3. Ajouter de l'acide sulfurique pour arrêter la coloration → Lire la DO à 450 nm (longueur d'onde de référence entre 620 et 690 nm^{*1})

4) DESCRIPTION DU MATERIEL FOURNI

- Les articles 1 - 6 dans le tableau des réactifs suivant doivent être réfrigérés entre 2 et 8 °C. La solution de lavage D (20X) et la solution d'arrêt de la réaction peuvent être stockées entre 2 et 30 °C.

ART ICL ES	Composants	Description	Qté par 96 tests	Qté par 480 tests
(1)	Plaque anti-HBs 	Plaque de microtitration tapissée d'anti-HBs monoclonaux de souris.	1 plaque	5 plaques
(2)	Solution de peroxydase anti-HBs 	Conjugué polyclonal anti-HBs HRPO, dilué dans un tampon avec stabilisateurs des protéines. Conservateurs : 0,003 % de Gentamycine et 0,01 % de Thimérosal. Colorant : rouge de phénol.	1 flacon, 8 ml	1 flacon, 25 ml
(3)	Contrôle HBsAg positif 	Sérum humain inactivé positif pour l'HbsAg, mais non réactif pour l'anti-HCV et l'anti-HIV1/2, dilué dans un tampon avec stabilisateurs des protéines. Conservateurs : 0,003 % de Gentamycine et 0,01 % de Thimérosal.	1 flacon, 1,5 ml	1 flacon, 3 ml
(4)	Contrôle HB négatif 	Sérum non réactif aux marqueurs HBV, anti-HCV et anti-HIV1/2, dilué dans un tampon avec stabilisateurs des protéines. Conservateurs : 0,003 % de Gentamycine et 0,01 % de Thimérosal.	1 flacon, 2 ml	1 flacon, 3 ml
(5)	Chromogène TMB concentré 	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dans une base organique.	1 flacon, 12 ml	1 flacon, 35 ml
(6)	Tampon du substrat 	Tampon acide acétique contenant de l'urée hydrogène peroxydase .	1 flacon, 12 ml	1 flacon, 35 ml
(7)	Solution de lavage conc. (20X) 	Tampon phosphate concentré avec du Tween-20	1 flacon, 58 ml	1 flacon, 250ml
(8)	Solution d'arrêt 	Acide sulfurique 2N	1 flacon , 12 ml	1 flacon, 50 ml

● AUTRE MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

ARTICLES	Composants
(1)	Des micropipettes de 50 µl, 100 µl et des embouts sont nécessaires.
(2)	Bain-marie ou incubateur avec contrôle de la température à +37 °C.
(3)	Matériel de lavage de la plaque.
(4)	Lecteur de microplaques ELISA : Longueur d'onde double à 450 nm avec longueur d'onde de référence entre 620 et 690 nm, bande passante de 10 nm*1.
(5)	Un analyseur de microplaque pour EIA totalement automatique est facultatif. L'utilisateur doit valider l'analyseur automatique de microplaque pour EIA par rapport au kit.





4.1) Conditions de stockage et stabilité du kit et des composants

Kit/composants	Temp. de stockage	État	Stabilité
Kit HBsAg Elisa	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Contrôle HBsAg positif	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Contrôle HB négatif	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Plaque anti-HBs	+2 à +8 °C	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois
Solution du conjugué Anti-HBs • HRPO	+2 à +8 °C	Original	18 mois
		Après ouverture	1 mois
Solution de lavage concentrée (20X)	Temp. ambiante	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois
Solution de lavage diluée 20X	Temp. ambiante +2 à +8 °C	Diluée	2 jours
		Diluée	1 semaine
Chromogène TMB concentré	+2 à +8 °C	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois
Tampon du substrat	+2 à +8 °C	Initial	24 mois
		Après ouverture	1 mois
Mélange substrat TMB	Temp. ambiante	Mélange	6 heures
Acide sulfurique 2N	Temp. ambiante	Original	24 mois
		Après ouverture	1 mois

5) Mode d'emploi

5.1) Avertissements :

- 5.1.1) Ce kit de réactifs est uniquement à usage professionnel.
- 5.1.2) **IVD** Ce kit de réactifs est uniquement destiné à un diagnostic *in vitro*.
- 5.1.3) Placer l'ensemble des réactifs du kit et des échantillons à température ambiante (+20 à +30 °C) et mélanger soigneusement avant utilisation.
- 5.1.4) Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
- 5.1.5) Ne pas échanger les réactifs entre différents lots.
- 5.1.6) Ne pas porter la pipette à la bouche.
- 5.1.7) Ne pas fumer ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont manipulés.
- 5.1.8) Tous les composants du kit et les échantillons doivent être considérés comme potentiellement dangereux pour la santé. Ils doivent être utilisés et éliminés conformément aux procédures de sécurité de votre laboratoire. Ces procédures de sécurité incluent probablement le port de gants de protection et éviter de produire des aérosols.

- 5.1.9) Les échantillons potentiellement infectieux et les déversements ou fuites non acides doivent être minutieusement nettoyés à l'aide d'hypochlorite de sodium à 5 % ou traités selon votre procédure de contrôle des risques biologiques potentiels.
- 5.1.10) Avant d'éliminer les échantillons et les kits de réactifs usagés dans les ordures ménagères, ils doivent être traités conformément à la procédure locale de traitement des déchets biologiques potentiellement dangereux ou comme suit :
- Les déchets liquides et solides doivent être stérilisés par autoclave à +121 °C pendant au moins 30 minutes.
- Les déchets solides peuvent également être incinérés.
- Les déchets liquides non acides peuvent être traités à l'aide d'hypochlorite de sodium dilué à une concentration finale de 1 %.
- Les déchets liquides acides doivent être neutralisés avant traitement à l'aide d'hypochlorite de sodium tel que mentionné ci-dessus et doivent être stérilisés pendant 30 minutes pour obtenir une désinfection effective.
- 5.1.11)  La solution d'arrêt est un irritant pour la peau, les yeux, les voies respiratoires et les muqueuses. Éviter le contact de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau. En cas d'inhalation, respirer immédiatement de l'air frais et consulter un médecin en cas de douleur.
- 5.1.12)   Le chromogène TMB concentré contient un solvant organique inflammable : risques d'effets graves irréversibles en cas d'inhalation, contact avec la peau ou ingestion. Le chromogène TMB concentré contient du sulfoxyde de diméthyle, un irritant pour la peau et les muqueuses.
- 5.1.13)  Bien que tous les échantillons d'origine humaine soient testés non réactifs pour l'anti-HCV et l'anti-HIV et ont été inactivés à +56 °C pendant une heure, le réactif doit être manipulé comme une substance potentiellement infectieuse.*2

5.2) Risques résiduels

- 5.2.1) Une opération incorrecte pourrait entraîner des résultats erronés.
- 5.2.2) L'utilisation du kit après la date d'expiration peut donner des résultats erronés.
- 5.2.3) Un lave-linge et un lecteur ELISA inefficaces pourraient affecter le résultat final.
- 5.2.4) Le stockage à une température plus élevée pourrait affecter la durée de vie du produit.
- 5.2.5) Le produit est à usage unique. La réutilisation pourrait entraîner des résultats erronés.
- 5.2.6) Toute modification de la procédure de test peut conduire à des résultats incorrects pouvant entraîner une erreur de diagnostic.

5.3) Collecte et préparation des échantillons pour analyse

- 5.3.1) Aucune préparation spéciale du patient n'est requise avant une prise de sang. Le sang doit être prélevé par des techniques médicales approuvées.
- 5.3.2) Des échantillons de sérum ou de plasma peuvent être utilisés avec ce kit de test. Les échantillons de sang total doivent être séparés au plus tôt pour éviter l'hémolyse. Toute particule (par ex., caillots de fibrine, érythrocytes) contenue dans l'échantillon doit être retirée avant utilisation.
- 5.3.3) Les échantillons doivent être stockés entre +2 et +8 °C et éviter l'inactivation par la chaleur pour minimiser la détérioration. Pour un stockage de longue durée, ils doivent être congelés en dessous de -20 °C. Un stockage en congélateur à dégivrage automatique n'est pas recommandé.
- 5.3.4) Les échantillons congelés doivent être entièrement décongelés et mélangés de façon homogène avant le test.
- 5.3.5) Éviter les procédures de congélation-décongélation multiples.

AVERTISSEMENT

1. L'échantillon ne doit contenir aucun composé d'AZOTURE qui inhibe l'activité de la peroxydase.
2. Les sérums partiellement coagulés et les échantillons avec une contamination bactérienne ne doivent pas être utilisés.

5.4) Conditions de stockage et stabilité des réactifs

- 5.4.1) Le kit doit être conservé entre +2 et +8 °C. Ne pas congeler.
- 5.4.2) Les barrettes de la plaque doivent être utilisées dans le mois suivant l'ouverture du sachet en aluminium d'origine. Les barrettes non utilisées doivent être conservées dans le sachet en aluminium qui doit être solidement fermé.

- 5.4.3) Replacer les réactifs entre +2 et +8 °C immédiatement après utilisation.
- 5.4.4) La solution de lavage concentrée (20X) peut être conservée à température ambiante pour éviter la cristallisation, car les kits sont conservés et expédiés entre +2 et +8 °C. Si des cristaux se sont formés avant utilisation, réchauffer la solution dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution des cristaux.

5.5) Procédure de lavage de la plaque

- 5.5.1) Préparation de la solution de lavage :
- Diluer la solution de lavage concentrée (20X) avec de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir une dilution 1:20. Ne pas utiliser d'eau du robinet.
- 5.5.2) Lavage de la plaque :
- (a) Pour un laveur de plaques avec fonction d'aspiration du trop-plein : 6 cycles avec au moins 0,5 ml de tampon de lavage par puits par cycle.**
- ou**
- (b) Pour un laveur de plaques sans fonction d'aspiration du trop-plein : 8 cycles avec au moins 0,35 ml de tampon de lavage par puits par cycle.**
- 5.5.3) Sécher en retournant la plaque et en la tapotant fermement sur du papier absorbant. Une trop grande quantité de tampon de lavage résiduel entraînera des résultats erronés.
- AVERTISSEMENT :** un lavage insuffisant entraînera des résultats erronés.

5.6) Procédure du test

- 5.6.1) Placer tous les réactifs et échantillons à température ambiante (+20 à +30 °C) avant l'essai. Régler le bain-marie ou l'incubateur à +37±1 °C.
- 5.6.2) Garder un puits pour le blanc. Ajouter 50 µl de chaque contrôle ou d'échantillon dans les puits appropriés de la plaque de microtitration (3 contrôles négatifs et 2 contrôles positifs).
- REMARQUE :**
- a. Utiliser un embout de pipette propre pour chaque prélèvement afin d'éviter la contamination croisée.
- b. Chaque plaque doit avoir respectivement des contrôles négatifs, des contrôles positifs et un puits pour le blanc.
- c. Ne pas utiliser la valeur du seuil de positivité établie pour d'autres plaques d'HBsAg Elisa.
- 5.6.3) Ajouter 50 µl de solution de peroxydase anti-HBs à chaque puits sauf au blanc.
- REMARQUE :** Ne pas toucher la paroi des puits de la plaque pour éviter la contamination.
- 5.6.4) Tapoter doucement la plaque.
- 5.6.5) Retirer le support de protection de la bande adhésive et la placer en appuyant sur la plaque de réaction de sorte qu'elle soit scellée hermétiquement.
- 5.6.6) Incuber la plaque de réaction dans un bain-marie ou un incubateur à +37±1 °C pendant **80 minutes**.
- 5.6.7) À la fin de la période d'incubation, retirer et jeter la bande adhésive et laver la plaque selon le paragraphe 5.4) Procédure de lavage de la plaque.
- 5.6.8) Sélectionner l'une des deux méthodes suivantes pour la coloration :
- A. Mélanger immédiatement avant utilisation des volumes identiques de **chromogène TMB concentré et de tampon du substrat** dans un récipient propre. Ajouter **100 µl** de la solution du mélange à chaque puits, y compris au blanc.
- B. Ajouter tout d'abord **50 µl** de **chromogène TMB concentré**, puis ajouter **50 µl** de **tampon du substrat** à chaque puits, y compris au blanc. Bien mélanger avec précaution.
- REMARQUE :** Le chromogène TMB concentré doit être incolore à bleu clair ; sinon il faut le jeter. Le mélange de chromogène TMB concentré et de tampon du substrat doit être utilisé dans les 6 heures après le mélange. Le mélange doit être tenu à l'écart de toute lumière intense.
- 5.6.9) Recouvrir la plaque d'un couvercle noir et incuber à **température ambiante** pendant **30 minutes**.
- 5.6.10) Stopper la réaction en ajoutant **100 µl** de solution d'arrêt à chaque puits, y compris au blanc.
- 5.6.11) Déterminer l'absorbance des contrôles et des échantillons dans les 30 minutes avec un spectrophotomètre de précision à 450/620-690 nm (longueur d'onde de lecture à 450 nm avec une longueur d'onde de référence entre 620 et 690 nm)*1.
- Utiliser le puits du blanc pour définir le zéro du spectrophotomètre.
- REMARQUE :** La couleur du puits du blanc doit être incolore à jaune clair ; sinon les résultats du test sont invalides.
- Blanc du substrat : la valeur de l'absorbance doit être inférieure à 0,100.

5.7) Calculs des résultats

5.7.1) Calcul du NC (absorbance moyenne du contrôle négatif).

Exemple : N° d'échantillon	Absorbance
1	0,022
2	0,025
3	0,023

$$NC = (0,022 + 0,025 + 0,023) / 3 = 0,023$$

Le NCx doit être $\leq 0,1$, sinon le test n'est pas valide.

5.7.2) Calcul du PC (absorbance moyenne du contrôle positif).

Exemple : N° d'échantillon	Absorbance
1	1,432
2	1,508

$$PC = (1,432 + 1,508) / 2 = 1,470$$

Le PC doit être $\geq 0,6$, sinon le test n'est pas valide.

5.7.3) Calcul de la **valeur P - N**

$$P - N = PC - NC$$

Exemple : NC = 0,024

PC = 1,470

$$P - N = 1,470 - 0,024 = 1,446$$

La valeur P - N doit être $\geq 0,5$, sinon le test n'est pas valide.

5.7.4) Calcul de la valeur du seuil de positivité

$$\text{Valeur du seuil de positivité} = NC + 0,025$$

Exemple :

$$\text{Valeur du seuil de positivité} = 0,023 + 0,025 = 0,048$$

5.8) Validité des runs de tests

5.8.1) Le NC doit être $\leq 0,1$, sinon le test n'est pas valide.

5.8.2) Le PC doit être $\geq 0,6$, sinon le test n'est pas valide.

5.8.3) La valeur P - N doit être $\geq 0,5$, sinon le test n'est pas valide.

REMARQUE : Contrôle négatif : la valeur de l'absorbance doit être inférieure ou égale à 0,100 après avoir soustrait le blanc.

5.9) Interprétation des résultats

5.9.1) Les échantillons présentant des valeurs d'absorbance **INFÉRIEURES** à la **valeur du seuil de positivité** sont **NON RÉACTIFS** et sont considérés comme **NÉGATIFS pour l'HBsAg**.

5.9.2) Les échantillons présentant des valeurs de l'absorbance **SUPÉRIEURES** ou **ÉGALES** à la **valeur du seuil de positivité** sont considérés comme **INITIALEMENT RÉACTIFS**. Les échantillons d'origine doivent être testés à nouveau en doublon.

5.9.3) Si les deux valeurs d'absorbance du nouveau test sont **inférieures** à la valeur du seuil de positivité, les échantillons sont considérés comme **NÉGATIFS pour l'HBsAg**.

Si, dans le nouveau test, au moins l'une des deux valeurs d'absorbance est **SUPÉRIEURE** ou **ÉGALE** à la **valeur du seuil de positivité**, les échantillons sont considérés comme **positifs pour l'HBsAg réitérés**. Les échantillons positifs réitérés seront confirmés à l'aide de Anti-HBsAg.

5.10) Résolution des problèmes

Si le résultat ne peut être reproduit, réaliser une procédure de contrôle préliminaire en vérifiant les possibilités ci-dessous :

5.10.1) Procédure de lavage inappropriée.

5.10.2) Contamination avec un échantillon positif.

5.10.3) Volume incorrect d'échantillon, du conjugué ou du substrat.

5.10.4) Contamination du bord du puits avec un conjugué.

5.10.5) Échantillon inapproprié, par exemple sérum ou plasma hémolysé, échantillon contenant des sédiments et échantillons insuffisamment mélangés avant utilisation.

5.10.6) Durée ou température d'incubation incorrecte.

- 5.10.7) Tête et aiguilles d'aspiration/distribution du laveur obstruées ou partiellement obstruées.
 5.10.8) Aspiration insuffisante.

5.11) Limites et interférences

- 5.11.1) Ce kit de réactifs doit être uniquement utilisé pour du sérum ou du plasma humain non mis en pool.
 5.11.2) Ce kit de réactifs n'a pas été validé pour une utilisation avec des échantillons prélevés sur des cadavres.
 5.11.3) Un résultat HBsAg négatif sans autre preuve ne doit pas être utilisé pour exclure une infection par HBV.
 5.11.4) Substances provoquant des interférences :

Les résultats suivants ont été obtenus lors d'expérimentations respectives :

1. Aucune interférence avec différents anticoagulants tels que l'héparine de lithium, l'EDTA, le citrate n'a été observée.
2. Les échantillons traités par la chaleur (+60 °C, 10 heures) ont présenté une diminution du titre d'HBsAg.
3. Aucune réactivité croisée n'a été détectée sur des échantillons provenant de patients présentant a) d'autres infections par HAV, EBV, CMV, HSV, VZV, Lyme Borreliosis, HCV, HIV, b) d'autres états pathologiques tels qu'insuffisance rénale, hémodialyse, hépatite auto-immune, cirrhose du foie et c) présence de certains anticorps tels que HAMA, GAD, IA2, APS.
4. Les échantillons contenant des substances pouvant provoquer des interférences [par ex., triglycérides (lipémie), hémoglobine (hémolyse), bilirubine (ictère), composants d'immunoglobuline monoclonale, niveaux élevés d'anticorps auto-immuns (facteur rhumatoïde (FR), anticorps antinucléaires (ANA), ou anticorps antimitochondriaux (AMA)] et les échantillons provenant de femmes enceintes n'ont pas provoqué d'interférences avec l'essai HBsAg Elisa.

5.12) Performance

5.12.1) Spécificité diagnostique

Résultats de l'évaluation européenne de la performance pour l'HBsAg Elisa de DIAsource – Réactivité des échantillons « Donneur » et « Clinique » HBV négatifs.

Nbre total d'échantillons	HBsAg Elisa de DIAsource					
	N	Nég	*IR	**RR	Confirmé	Faux positif
HBV négatif (échantillon clinique)	213	211	2	2	0	2
HBV négatif (échantillon donneur)	5501	5479	22	22	0	22
Total	5714	5690	24	24	0	24

*IR : initialement réactif **RR : réactif réitéré

Spécificité diagnostique = $5690/5714 = 99,58 \%$

5.12.2) Sensibilité diagnostique

1. La sensibilité diagnostique déterminée dans les évaluations européenne de la performance a donné les résultats suivants :

Échantillon	Nbre d'échantillons	Réactifs	Sensibilité
Sérums HBsAg positifs	400	400	100 %

Sensibilité diagnostique = $400/400 = 100 \%$

2. L'évaluation de l'HBsAg Sensitivity Panel PHA807 (BBI, États-Unis) a donné les résultats suivants :

Panel	Nbre de membres du panel	Résultats
Panel de sensibilité HBsAg PHA807 (BBI)	PHA807-01 ~ 21	Équivalents ou meilleurs que les concurrents.

3. L'évaluation de l'HBsAg Mixed Titer Performance Panel PHA205 (BBI, États-Unis) a donné les résultats suivants :

Panel	Nbre de membres du panel	Résultats

Panel de performance d'un mélange de titres HBsAg PHA205 (BBI)	PHA205-01 ~ 25	Équivalents ou meilleurs que les concurrents.
--	----------------	---

4. L'évaluation du HBsAg Mixed Titer Performance Panel VHA601 (BBI, États-Unis) a donné les résultats suivants :

Panel	Nbre de membres du panel	Résultats
Panel de performance d'un mélange de titres HBsAg VHA601 (BBI)	VHA601-01 ~ 06	Rencontre les résultats du BBI escomptés.

5. L'évaluation du HBsAg Mixed Titer Performance Panel QHA711 (BBI, États-Unis) a donné les résultats suivants :

Panel	Nbre de membres du panel	Résultats
Panel de performance d'un mélange de titres HBsAg QHA711 (BBI)	QHA711-01 ~ 06	Rencontre les résultats du BBI escomptés.

6. Résultats du test avec l'INTS HBsAg Subtype Panel :

Les résultats de l'évaluation démontrent que l'ensemble des sérotypes HBsAg connus (sous-types HBsAg) disponibles dans le panel des sous-types HBsAg INTS peuvent être détectés aussi bien par l'HBsAg Elisa que par l'essai de référence à des dilutions pouvant aller jusqu'à $10^4 \times$ ~ $10^6 \times$.

7. Tableau de synthèse de l'évaluation de l'ensemble des panels de séroconversion testés :

ID du panel	Résultat HBsAg positif à compter de la date du premier prélèvement sanguin			
	Essai HBsAg de référence (A en jours)	HBsAg Elisa (B en jours)	Différence de jours de prélèvement (A-B)	Différence du nombre de prélèvements (nbre de membres du panel)
PHM907 (ay)	50	50	0	0
PHM916 (ay)	62	65	-3	-1
PHM920 (ad)	26	26	0	0
PHM921 (ad)	0	0	0	0
PHM930 (ad)	3	3	0	0
PHM933 (ad)	7	9	-2	-1
PHM934 (ad)	0	0	0	0
PHM935A (ad)	9	21	-12	-3
PHM935B (ad)	231	217	14	-1
NabiSB0411	6	6	0	0
PHM903 (ad)	6	10	-4	-1
PHM904 (ad)	7	18	-11	-1
PHM906 (ad)	137	0	137	1
PHM909 (ad)	9	9	0	0
PHM910 (ad)	35	18	17	1
PHM912 (ad)	42	0	42	7
PHM914 (ad)	0	146	-146	-1
PHM915 (ind)	12	28	-16	-5
PHM917 (ind)	36	>43	->7	->2
PHM918 (ad)	7	7	0	0
PHM923 (ay)	15	21	-6	-1
PHM924 (ad)	29	35	6	1
PHM925 (ind)	8	14	-6	-1
PHM926 (ind)	13	15	-2	-1
PHM927 (ind)	4	7	-3	-1
PHM928 (ad)	9	9	0	0
PHM929 (ad)	14	18	-2	-1

PHM931 (ind)	19	21	-2	-1
PHM932 (ad)	61	61	0	0
PHM935A (ad)	21	28	-7	-2
Total	-----	-----	Somme = -13	-----
		Moyenne	-13/30 = 0,4 jour	-----

Synthèse de l'évaluation de l'ensemble des panels de séroconversion testés :

Les résultats ont montré que l'HBsAg Elisa est quasiment équivalent à l'essai de référence. En moyenne, le test HBsAg Elisa a seulement 0,4 jour de retard par rapport à l'essai de référence dans les 30 panels de séroconversion testés.

5.12.3) Mutants

1. Panel mutant

Un panel de mutants dans le PreCore de l'hépatite B de Teragenix, États-Unis a été testé. L'HBsAg Elisa peut détecter les résultats pour un rapport de dilution du panel de 1:2 ou 1:5.

Ce panel contient 3 échantillons de Promoteur Core (A1762/G1764) de type sauvage ; mutant dans le codon 28 de la région PreCore/infection de type sauvage, 4 échantillons de Promoteur Core (A1762/G1764) de type sauvage ; mutant dans le codon 28 de la région PreCore, 2 échantillons de Promoteur Core (T1762/A1754) MUTANT/(A1762/G1754) infection mélangée de type sauvage.

2. Échantillons mutants

Le taux de détection de l'HBsAg Elisa est 17/21, soit un meilleur résultat que le kit de référence (14/21).

Mutation	HBsAg Elisa	Kit de référence	Mutation	HBsAg Elisa	Kit de référence
	Int	Int		Int	Int
113A114	positif	positif	C137W	positif	négatif
P120L	positif	positif	C139Y	positif	positif
R122I	négatif	négatif	K141E	positif	positif
R122T	positif	positif	P142L/G145R	négatif	négatif
E122I	positif	positif	P142L	positif	positif
T123N	positif	positif	D144G	positif	négatif
122RA123	négatif	négatif	G145K	positif	négatif
C124R	négatif	négatif	C147T/C148T	positif	positif
T131I	positif	positif	E164D	positif	positif
T131P	positif	positif	S174N	positif	positif
Y134S	positif	positif			
Taux de détection	8/11	8/11	Taux de détection	9/10	6/10

5.12.4) 25 échantillons positifs frais du même jour

L'HBsAg Elisa a détecté 25 échantillons positifs frais du même jour. Les critères du chapitre 3.1.9 de la 2009/886/CE ont été satisfaits.

5.12.5) Sensibilité analytique

Étalons	Sensibilité calculée
2° étalon international de l'OMS*	0,03 UI/ml
Étalon PEI sous-type ad	0,08 PEI U/ml
Étalon PEI sous-type ay	0,09 PEI U/ml

* Seconds étalons internationaux de l'OMS pour l'HBsAg, sous-type adw2, génotype A, code NIBSC : 00/588

5.12.6) Précision

1. Reproductibilité intra-essai

La précision intra-essai a été déterminée à l'aide d'un échantillon de contrôle positif et de deux échantillons de sérum de patient de différentes concentrations en HBsAg (taux légèrement supérieur au niveau du seuil de positivité et taux moyen) qui ont été analysés 20 fois en un seul run sur 3 jours.

Série	ID échantillon	Moyenne	Écart type	Coefficient de variation
1	PC 1 :32	0,7541	0,0857	11,36
1	PS 1 :32	2,2766	0,1571	6,90
1	PS 1 :64	1,3159	0,1168	8,88
2	PC 1 :32	0,9671	0,0358	3,70
2	PS 1 :32	2,7325	0,1025	3,75
2	PS 1 :64	1,5822	0,0888	5,61
3	PC 1 :32	0,9669	0,0909	9,40
3	PS 1 :32	2,6088	0,2367	9,07
3	PS 1 :64	1,6502	0,1499	9,08

Le CV calculé variait entre 3,7 % et 11,36 %. (= valeur acceptable pour un essai immuno-enzymatique sous forme de plaque de microtitration).

2. Reproductibilité inter-essai

Les essais pour l'évaluation de la précision ont été réalisés sur 10 jours à l'aide de cinq échantillons de sérum (avec un taux d'HBsAg à peine positif et un taux nettement supérieur au seuil de positivité).

ID échantillon	N	Moyenne	Écart type	Coefficient de variation
F1	10	0,0609	0,0185	30,41
F2	10	0,0770	0,0189	24,56
F3	10	0,1000	0,0245	24,51
F4	10	0,1786	0,0462	25,87
F5	10	0,6107	0,1412	23,12

Le CV calculé variait entre 30,4 % pour un échantillon HBsAg négatif et 23,1 % pour un échantillon HBsAg faiblement positif (= valeurs acceptables pour l'imprécision inter-essai d'un essai immuno-enzymatique sous forme de plaque de microtitration).

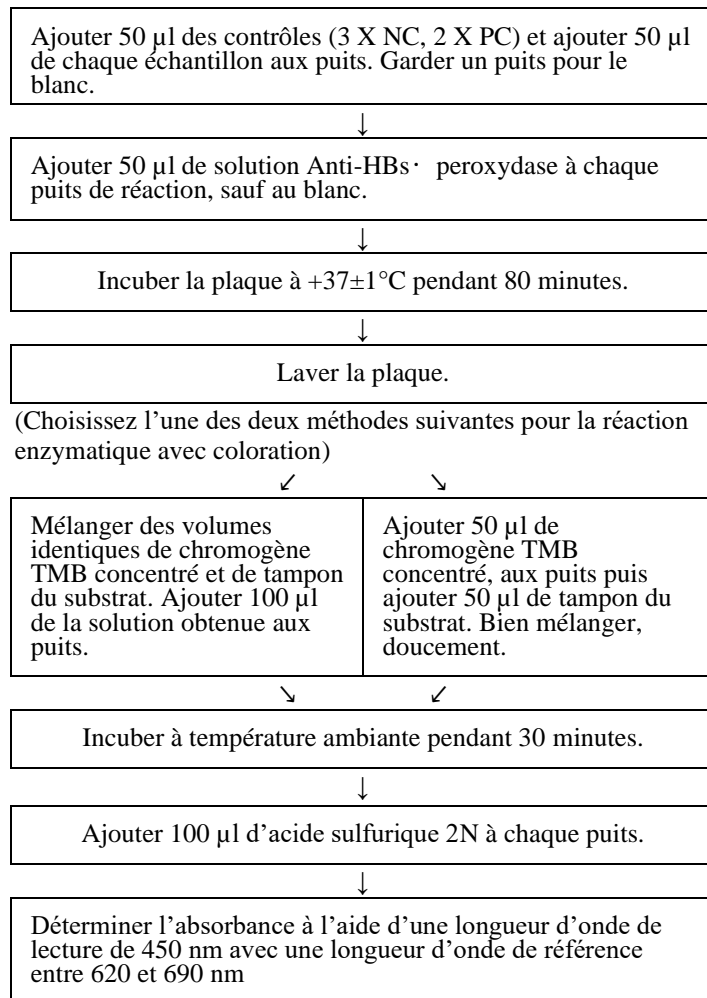
5.12.7) Excès d'antigène/effet crochet (Hook effect) à dose élevée

Cette étude a été réalisée en testant, avec l'essai HBsAg Elisa de DIASource, des dilutions en série d'un échantillon de sérum ayant une concentration très élevée en HBsAg de 125 mg/l. Aucun effet crochet à dose élevée n'a été observé.

5.12.8) Traçabilité

L'HBsAg Master Calibrator de DIASource a été calibré par rapport à l'étalon de travail HBsAg britannique (British Working Standard for HBsAg) (NIBSC-Code : 01/476-006) à l'aide de l'essai **HBsAg Elisa**. L'efficacité relative (rapport) de l'étalon de travail HBsAg britannique par rapport à l'HBsAg Master Calibrator de DIASource est de 4,081 (3,853-4,325 IC à 95 %). La concentration du contrôle positif de l'essai **HBsAg Elisa** a été déterminée par rapport à l'HBsAg Master Calibrator de DIASource et a été établie à 42 UI/ml \pm 20 %.

5.13) Représentation graphique de la procédure de test



6) REMARQUES

- *1 La longueur d'onde de référence du photomètre à utiliser peut varier entre 620 nm et 690 nm. Toutefois, l'utilisateur doit valider le photomètre par rapport à l'**HBsAg Elisa**.
- *2 Inactivation incomplète du virus de l'hépatite B après un traitement à la chaleur à +60 °C pendant 10 heures, J. Infect. Dis. 138:242-244.

7) BIBLIOGRAPHIE

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A „new“ antigen in leukemia sera. JAMA, 1965;191:101- 106.
2. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970; 1: 695 - 698.
3. Aach RD, Grisham JW, Paker CW. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc Natl Acad Sci. USA 1971;68:1056-1060.
4. Kim CY, Tikes JG. Purification and biophysical characterization of hepatitis antigen. J Clin Invest. 1973; 52:1176-1186.
5. Wolters G, Kuijpers LP, Kacaki J, Schuurs AH, Enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen. J Infect. Dis 1977;136:Suppl 311-377.
6. Shih JW, Cote PJ Jr, Dapolito GM, Gerin JL. Production of monoclonal antibodies against hepatitis B surface antigen (HBsAg) by somatic cell hybrids. J Virol Methods. 1980;1:257-273.
7. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Semin Liver Dis. 1991;11:73-83

Date de révision : 2020-02-24



HBsAg Elisa

es

Para la detección cualitativa del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en suero o plasma humano.

KAPG4SGE3 : 96 ensayos / KAPG4SGE11 : 480 ensayos

PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) USO PREVISTO

El kit de diagnóstico **HBsAg ELISA** es un inmunoensayo enzimático in vitro para la detección cualitativa del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en suero o plasma humano (heparina, citrato o EDTA).

2) RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es el primer marcador que aparece en la sangre después de la infección con el virus de la hepatitis B (VHB) algunos días o semanas antes que se manifiesten los síntomas clínicos. Es un polipéptido lipoproteína que forma la envoltura externa del virus de HB. La detección de HBsAg en suero humano o plasma indica que hay una infección de VHB aguda o crónica en curso. El ensayo HBsAg se usa no solo para diagnosticar infecciones con VHB sino también para monitorizar el curso de la enfermedad y la eficiencia de la terapia anti-viral.

HBsAg ELISA es un ensayo rápido para la detección cualitativa de la presencia de HBsAg en la muestra de suero o plasma (heparina, citrato EDTA). El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales y policlonales (anti-cobaya) para detectar selectivamente niveles altos de HBsAg en suero o plasma.

Las muestras que no son reactivas con **HBsAg ELISA** se consideran negativas para HBsAg. Las muestras con una reacción positiva deben ser repetidas en duplicado.

En caso de obtener un resultado reactivo en una repetición, la muestra debe ser confirmada para la reactividad con HBsAg usando reactivos de confirmación validados.

Se considera que solo las muestras positivas confirmadas contienen HBsAg.

3) DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

HBsAg Elisa es un inmunoensayo enzimático de fase sólida (ELISA= *enzyme-linked immunosorbent assay*) – basado en "principio del sándwich".

La fase sólida de la microplaca está formada por pocillos de poliestireno, recubiertos con anticuerpos monoclonales de ratón, específicos para HBsAg; en cambio el anticuerpo policlonal de cobayo, purificado por cromatografía de afinidad se usa para preparar el conjugado de anti-HBs• peroxidasa (rábano picante) en fase líquida.

Cuando una muestra de suero o plasma que contiene HBsAg se agrega a un pocillo recubierto con anticuerpos anti-HBs junto con el anticuerpo anti-HBs conjugado con peroxidasa y se incuban, se formará un complejo anticuerpo-HBsAg-anticuerpo-pocillo recubierto en el pocillo.

Después de lavar la microplaca para eliminar el material que no se ha unido, se agrega una solución de sustrato TMB a los pocillos y se incuban. El color se desarrolla proporcionalmente a la cantidad de HBsAg que se ha unido al Anti-HBs. La reacción peroxidasa-TMB se detiene agregando ácido sulfúrico. La densidad óptica del color que se ha generado se mide con un fotómetro adecuado a 450 nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690 nm^{*1}.

El principio del ensayo descrito anteriormente se ilustra también en el siguiente diagrama.

A Muestra que contiene **HBsAg**:


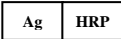
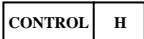

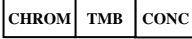
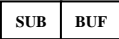

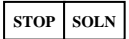
1. Placa (Anti-HBs) + muestra (HBsAg) + Anti-HBs • peroxidasa
→ HBsAg • Anti-HBs • (Anti-HBs • peroxidasa) complejo de sándwich
2. Complejo de sándwich + solución de sustrato TMB → color de azul a celeste
3. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color → Lea la DO a 450nm/620-690 nm^{*1}

B Muestra sin **HBsAg**:

1. Placa (Anti-HBs) + muestra (sin HBsAg) + Anti-HBs • peroxidasa → Anti-HBs (en los pocillos)
2. Anti-HBs (en los pocillos) + solución de sustrato TMB → Incoloro a azul claro
3. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color → Lea la DO a 450nm/620-690 nm^{*1}

4) DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS

- Items 1 - 6 en la siguiente tabla de reactivos deben mantenerse refrigerados entre + 2 y +8°C. La Solución de Lavado (20X) y la solución de parada pueden almacenarse entre +2 y +30°C.

ITEMS	Componentes	Descripción	Cant. para 96 ensayos	Cant. para 480 ensayos
(1)	Anti-HBs Placa 	Microplaca recubierta con anti-HBs monoclonal de ratón.	1 placa	5 placas
(2)	Solución Anti-HBs · Peroxidasa 	Conjugado Anti-HBs HRPO policlonal diluido en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%. Tinción: rojo fenol.	1 vial, 8 ml	1 vial, 25 ml
(3)	Control Positivo HBsAg 	Suero humano inactivado positivo para HBsAg pero no-reactivo con anti-VHC y anti-VIH1/2, diluido en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 1.5 ml	1 vial, 3 ml
(4)	Control Negativo HB 	Suero no reactivo para VHB marcadores anti-VHC y anti-VHI 1/2, diluido en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 2 ml	1 vial, 3 ml
(5)	TMB Cromogénico concentrado 	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en una base orgánica.	1 vial, 12 ml	1 vial, 35 ml
(6)	Tampón del Sustrato 	Tampón de ácido acético con urea hidrógeno peroxidasa.	1 vial, 12 ml	1 vial, 35 ml
(7)	Solución de Lavado Conc. (20x) 	Tampón concentrado de fosfato con Tween-20	1 vial, 58 ml	1 vial, 250ml
(8)	Solución de Parada 	2N ácido sulfúrico	1 vial, 12 ml	1 vial, 50 ml

• OTROS MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS





ITEMS	Componentes
(1)	Micropipetas y puntas de 50µl y 100 µl
(2)	Incubadora o baño maría con control de temperatura a +37 °C.
(3)	Equipo para lavado de placas.
(4)	Lector de microplacas ELISA: Longitud de onda dual 450nm con longitud de onda de referencia de 620-690nm, ancho de banda 10nm*1.
(5)	Un analizador EIA de microplacas totalmente automático es opcional. El usuario debe validar el equipo en conjunto con el kit.

4.1) CONDICIONES DE ALMACENAJE Y ESTABILIDAD DEL KIT Y SUS COMPONENTES*

Kit/componentes	Condición de almacenaje	Estado	Estabilidad
HBsAg ELISA kit	+2 to +8°C	Original	18 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control positivo HBsAg	+2 to +8°C	Original	18 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control Negativo HB	+2 to +8°C	Original	18 meses
		Una vez abierto	1 mes
Placa Anti-HBs	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución Conjugado Anti-HBs · HRPO	+2 to +8°C	Original	18 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Concentrada (20x)	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Diluida 20x	Temp ambiente	Diluido	2 días
	+2 to +8°C	Diluido	1 semana
TMB cromogénico concentrado	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Tampón del sustrato	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Mezcla de Solución de Sustrato TMB	Temp ambiente	Mezcla	6 horas
2N ácido sulfúrico	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes

5) INSTRUCCIONES DE USO

5.1) Advertencias:

- 5.1.1) Este kit de reactivos es sólo para uso profesional.
- 5.1.2)  Este kit de reactivos es sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- 5.1.3) Procure que todos los reactivos del kit y las muestras alcancen temperatura ambiente (+20 to +30 °C) y mézclelos cuidadosamente antes de usar.
- 5.1.4) No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- 5.1.5) No intercambie reactivos entre lotes diferentes.
- 5.1.6) No pipetee con la boca.
- 5.1.7) No fume o coma en zonas donde se manipulan muestras o reactivos.
- 5.1.8) Todos los componentes y muestras del kit deben considerarse potencialmente peligrosos para la salud. Deben usarse y eliminarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio del usuario. Estos procedimientos de seguridad probablemente incluirán el uso de guantes de protección y evitar la generación de aerosoles.
- 5.1.9) Las muestras potencialmente infecciosas y derrames o goteos que no contienen ácidos deben ser limpiados concienzudamente con hipoclorito de sodio al 5% o tratado de acuerdo con las prácticas del laboratorio para el control de un potencial riesgo biológico.
- 5.1.10) Antes de eliminar los desechos de las muestras usadas y reactivos del kit como desechos generales, estos deben ser tratados de acuerdo con el procedimiento local para desecho con potencial riesgo biológico o tratado como sigue:
Tanto los desechos sólidos como los líquidos deben ser autoclavados a +121 °C por lo menos por 30 minutos.
El desecho sólido también se puede incinerar.
El desecho líquido no ácido puede tratarse con hipoclorito de sodio diluido a una concentración final de 1%.
Los desechos ácidos deben ser neutralizados antes de tratarlos con hipoclorito de sodio como se mencionó antes y debe mantenerse por 30 minutos para obtener una desinfección efectiva.
- 5.1.11)  La solución de parada es irritante para los ojos, la piel, vías respiratorias y membranas mucosas. Evite el contacto de la solución de parada con la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lave con copiosa cantidad de agua inmediatamente. En caso de inhalación, proporcione aire fresco y busque ayuda médica en caso de molestias.
- 5.1.12)   El TMB cromogénico concentrado contiene un disolvente orgánico, que es inflamable: peligro de efectos graves irreversibles por inhalación, contacto con la piel o ingestión. El TMB cromogénico concentrado contiene dimetil sulfóxido, un irritante para la piel y membranas mucosas.



- 5.1.13) A pesar de que todo el material de origen humano ha resultado no reactivo para anti-VHC y Anti-VIH y ha sido inactivado a +56 °C por una hora, el reactivo debe manipularse como material potencialmente infeccioso.*7

5.2) Riesgos residuales

- 5.2.1) Una operación incorrecta podría conducir a resultados incorrectos.
- 5.2.2) El uso del kit después de la fecha de caducidad puede dar lugar a resultados incorrectos.
- 5.2.3) La lavadora ineficiente y el lector ELISA podrían afectar el resultado final.
- 5.2.4) El almacenamiento a temperaturas más altas podría afectar la vida útil del producto.
- 5.2.5) El producto es para un solo uso. La reutilización podría conducir a resultados incorrectos.
- 5.2.6) Cualquier cambio en el procedimiento de prueba puede conducir a resultados incorrectos que podrían causar un error de diagnóstico.

5.3) Toma de Muestra y Preparación para el Análisis

- 5.3.1) El paciente no requiere preparación especial antes de la toma de la muestra. La sangre debe ser tomada con técnicas médicas aprobadas.
- 5.3.2) Con este kit se puede usar suero o plasma. La muestra de sangre total debe separarse lo antes posible para evitar hemólisis. Cualquier partícula presente en la muestra (por ej. glóbulos rojos, coágulos de fibrina) deben removerse antes de usar.
- 5.3.3) Las muestras deben almacenarse de +2 a +8 °C y evitar inactivación por calor para minimizar el deterioro. Para almacenar por periodos largos, las muestras se deben congelar por debajo de -20 °C. No se recomienda almacenarlas en congeladores que se auto descongelan.
- 5.3.4) Las muestras congeladas deben ser descongelados completamente y mezcladas en forma homogénea antes del ensayo.
- 5.3.5) Evite congelar y descongelar en forma sucesiva
- 5.3.6) **ADVERTENCIA**

- 1. La muestra no debe contener compuestos de azida que puedan inhibir la actividad de la peroxidasa en el conjugado.
- 2. Muestras de suero coaguladas y muestras con contaminación bacteriana no deben ser usadas

5.4) Almacenaje y estabilidad de los componentes

- 5.4.1) El kit debe almacenarse entre +2 y +8 °C. No congelar.
- 5.4.2) Las tiras de las placas debes usarse dentro de 2 meses después de abrir la bolsa original de aluminio. Las tiras no usadas deben permanecer en la bolsa de aluminio firmemente sellada.
- 5.4.3) Almacene los reactivos nuevamente entre +2 y +8 °C inmediatamente después de su uso.
- 5.4.4) El concentrado (x20) de la solución de lavado es almacenado y transportado entre +2 y +8 °C, lo que puede causar cristalización. Si hay precipitado de cristales antes del uso, caliente la solución en un baño maría a +37 °C hasta que los cristales se disuelvan.

5.5) Procedimiento de lavado de placas

- 5.5.1) Preparación de la solución de lavado:
Diluya la solución de Lavado (x20) con agua destilada o desionizada a una dilución de 1:20. No use agua del grifo.
- 5.5.2) Lavado de las placas:
 - (a) Para un lavador de placas con función de aspiración de desborde: 6 ciclos de por lo menos 0,5 ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo
 - o
 - (b) Para un lavador sin la función de aspiración de desborde: 8 ciclos de por lo menos 0,35ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo.
- 5.5.3) Seque invirtiendo la placa sobre un papel absorbente y golpeándola enérgicamente. Si queda demasiado tampón de lavado residual, podría causar resultados falsos.
¡ADVERTENCIA!
Un lavado inadecuado causará resultados falsos.

5.6) Procedimiento del Ensayo

- 5.6.1) Asegúrese de que todos los reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente (+20 a +30 °C) antes del ensayo. Ajuste el baño maría o incubadora a +37±1 °C.
- 5.6.2) Reserve un pocillo para el blanco. Agregue 50µl de cada control o muestra a los pocillos correspondientes en la placa donde ocurrirá la reacción (3 Controles Negativos y 2 Controles Positivos).



NOTA:

- a) Use una punta nueva de pipeta para cada muestra para evitar contaminación cruzada

- b) Cada placa necesita sus propios controles negativos, positivos y pocillos blancos.
 c) No use el valor de corte establecido para otras placas de HBsAg Elisa..
- 5.6.3) Agregue 50 µl de solución de anti-HBs* Peroxidasa a cada pocillo excepto a el blanco.



NOTA: No toque la pared del pocillo para evitar contaminación.

- 5.6.4) Golpee la placa suavemente.
 5.6.5) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.
 5.6.6) Incube la placa a $+37\pm 1^\circ\text{C}$ en baño maría o una incubadora por 80 minutos.
 5.6.7) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo "5.4. PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS".
 5.6.8) Seleccione uno de los dos métodos siguientes para desarrollar el color:
 A. Mezcle volúmenes iguales de TMB **cromogénico concentrado** y **Tampón de sustrato** en un recipiente limpio inmediatamente antes de usar. Agregue 100 µl de la solución de la mezcla a cada pocillo incluyendo el pocillo blanco.
 B. Agregue primero **50 µl** de **TMB cromogénico concentrado** y luego agregue **50 µl** de **Tampón del sustrato** a cada pocillo incluyendo el blanco. Mezcle suavemente.



NOTA: El TMB cromogénico concentrado debe ser entre incoloro y celeste; de otro modo debe ser eliminado. La mezcla de TMB cromogénico concentrado con tampón del sustrato debe usarse dentro de 6 horas a partir del momento de la mezcla. La mezcla debe protegerse de la luz intensa.

- 5.6.9) Cubra la placa con la cubierta negra e incube a temperatura ambiente por 30 minutos.
 5.6.10) Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo el blanco.
 5.6.11) Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 30 minutos con un fotómetro de precisión a 450 / 620-690 nm (Longitud de onda de 450 nm para la lectura con 620-690 nm de longitud de onda de referencia)*1. Use el blanco para blanquear el fotómetro.



NOTA:

El color del blanco debe ser de incoloro a amarillento pálido; de otro modo el ensayo es inválido. En este caso el ensayo debe ser repetido.
 Blanco Sustrato: la absorbancia debe ser menor de 0,100.

5.7) Cálculo de los resultados del ensayo

- 5.7.1) Cálculo de la CN (Absorbancia promedio del Control Negativo).

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.022
2	0.025
3	0.023

$$\text{CN} = (0.022 + 0.025 + 0.023) / 3 = 0.023$$

CNx debe ser ≤ 0.1 de otro modo el ensayo es inválido.

- 5.7.2) Cálculo de CP (Absorbancia Promedio del Control Positivo)

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	1.432
2	1.508

$$\text{CP} = (1.432 + 1.508) / 2 = 1.470$$

CPx debe ser ≥ 0.6 de otro modo el ensayo es inválido.

- 5.7.3) Cálculo del Valor P - N

$$\text{P - N} = \text{PC} - \text{NC}$$

Ejemplo NC = 0.024

PC = 1.470

$$\text{P - N} = 1.470 - 0.024 = 1.446$$

El valor P - N debe ser ≥ 0.5 de otro modo el ensayo es inválido.

- 5.7.4) Cálculo del Valor de Corte

$$\text{Valor de Corte} = \text{NC} + 0.025$$

Ejemplo:

$$\text{Valor de corte} = 0.023 + 0.025 = 0.048$$

5.8) Validez de los Ensayos

5.8.1) CN debe ser ≤ 0.1 de otro modo el ensayo es inválido.

5.8.2) CP debe ser ≥ 0.6 de otro modo el ensayo es inválido.

5.8.3) Valor de P-N debe ser ≥ 0.5 de otro modo el ensayo es inválido.

NOTA: Control Negativo: la absorbancia debe ser menor o igual a 0,100 después de restar el blanco.

5.9) Interpretación de los Resultados

5.9.1) Las muestras con absorbancias **MENORES** que el **Valor de Corte** son **NO REACTIVAS** y se consideran **NEGATIVAS** para **HBsAg**.

5.9.2) Las muestras con absorbancias **MAYORES** o **IGUALES** al **Valor del Corte** se consideran **INICIALMENTE REACTIVAS**. Las muestras originales deben ser repetidas en duplicado.

5.9.3) Si ambos valores de absorbancia al repetir son **menores** que el valor de corte, las muestras se consideran **NEGATIVAS para HBsAg**.

Si al repetir al menos uno de los dos valores de absorbancia es **MAYOR** o **IGUAL** al **Valor del Corte** entonces la muestra se considera como un **HBsAg positivo repetido**. La muestra positiva repetida debe ser confirmada con Antisurgen B.

5.10) Solución de Problemas

Si el resultando no puede ser reproducido, una solución preliminar podría obtenerse revisando las posibilidades mencionadas a continuación:

5.10.1) Procedimiento de lavado inadecuado.

5.10.2) Muestra contaminada con positivo.

5.10.3) Volumen de muestra, conjugado o sustrato equivocado.

5.10.4) Contaminación del borde del pocillo con conjugado.

5.10.5) Muestra inadecuada, p.ej. suero o plasma hemolizados, muestra con precipitado, muestra no suficientemente mezclada antes del uso.

5.10.6) Tiempo o temperatura de incubación equivocados.

5.10.7) Cabeza y agujas de la lavadora para dispensar/aspirar total o parcialmente obstruidas.

5.10.8) Aspiración insuficiente.

5.11) Limitaciones e Interferencias

5.11.1) Este kit de reactivos es para ser usado con muestras de suero o plasma humano individual.

5.11.2) El kit no ha sido validado par uso con muestras de cadáver.

5.11.3) Un resultado negativo para HBsAg sin otra evidencia no debe ser usado para excluir una infección por VHB.

5.11.4) Sustancias que podrían interferir:

Los siguientes resultados se obtuvieron en los respectivos experimentos:

1. No se ha observado interferencia con diferentes anticoagulantes tales como heparina con litio, K-EDTA, citrato de sodio.
2. Muestras que han sido tratadas con calor (+60°C, 10 horas) resultaron con títulos de HBsAg disminuidos.
3. No se detectó reacción cruzada al usar muestras de pacientes con a) otras infecciones VHA, VEB, CMV, VHS, VZV, Borreliosis de Lyme, VHC, VHI, b) con otras enfermedades tales como insuficiencia renal crónica, hemodiálisis, hepatitis autoinmune, cirrosis hepática y c) con algunos anticuerpos tales como HAMA, GAD, IA2, APS.
4. Las muestras que contienen sustancias que podrían interferir [P. ej. Triglicéridos (lipemia), hemoglobina (hemolisis) bilirrubina (ictericia) componentes de la inmunoglobulina monoclonal, niveles altos de anticuerpos autoinmunes (factor reumatoide-FR, anticuerpos anti nucleares-ANA, o anticuerpos anti mitocondria-AMA)] y muestras de mujeres embarazadas, no interfirieron con el ensayo HBsAg ELISA.

5.12) Características del Ensayo

5.11.1) Especificidad Diagnostica

Resultados de la Evaluación Europea del Desempeño del HBsAg ELISA de DIASource – La Reactividad del “Donante” Negativo para VHB y Muestras “Clínicas”.

No. Total de muestras	DIASource HBsAg Elisa					
	N	Neg	*IR	**RR	Confirmado	Falso Positivo
VHB negativo (muestra clínica)	213	211	2	2	0	2
VHB negativo (muestra de donante)	5501	5479	22	22	0	22
Total	5714	5690	24	24	0	24

*IR: inicialmente reactivo **RR: reactivo repetido

Especificidad diagnóstica = $5690/5714 = 99.58\%$

5.12.2) Sensibilidad Diagnóstica

1. La sensibilidad diagnóstica determinada en evaluaciones Europeas de desempeño produjeron los siguientes resultados:

Muestra	No. de muestras	Reactivas	Sensibilidad
Suero HBsAg positivo	400	400	100%

Sensibilidad diagnóstica = $400/400 = 100\%$

2. La evaluación del Panel de Sensibilidad para HBsAg (BBI, USA) produjo los siguientes resultados:

Panel	No. De miembros del panel	Resultados
Panel de Sensibilidad para HBsAg BBI PHA807	PHA807-01 ~ 21	Equivalente a o mejor que la competencia

3. La evaluación del Panel de Desempeño con una Variedad de Títulos para HBsAg, PHA205 (BBI, USA) produjo los siguientes resultados:

Panel	No. De miembros del panel	Resultados
Panel de Desempeño con una Variedad de Títulos para HBsAg BBI PHA205	PHA205-01 ~ 25	Equivalente a o mejor que la competencia

4. La evaluación del Panel de Desempeño con una Variedad de Títulos para HBsAg, VHA601 (BBI, USA) produjo los siguientes resultados:

Panel	No. De miembros del panel	Resultados
Panel de Desempeño con una Variedad de Títulos para HBsAg, BBI VHA601	VHA601-01 ~ 06	Alcanzó los resultados esperados por BBI.

5. La evaluación del Panel de Desempeño con una Variedad de Títulos para HBsAg, QHA711 (BBI, USA) produjo los siguientes resultados:

Panel	No. De miembros del panel	Resultados
Panel de Desempeño con una Variedad de Títulos para HBsAg, BBI QHA711	QHA711-01 ~ 06	Alcanzó los resultados esperados por BBI.

6. Resultado del Panel INTS de Subtipos de HBsAg:

El resultado de la evaluación demuestra que todos los serotipos conocidos de HBsAg (subtipos de HBsAg) disponibles en el panel INTS de subtipos de HBsAg pueden ser detectados tanto por e Elisa HBsAg como por el ensayo de referencia hasta las diluciones $10^4x \sim 10^6x$.

7. Tabla de resumen de la evaluación de todos los paneles de seroconversión:

ID Panel	Resultados HBsAg Positivos Desde la Fecha de la Primera Toma de Muestra			
	Ensayo HBsAg de referencia (A en días)	Elisa HBsAg (B en días)	Diferencia en días de toma de muestra (A-B)	Diferencia en número de tomas de muestra (No. De miembro del panel)
PHM907(ay)	50	50	0	0
PHM916(ay)	62	65	-3	-1
PHM920(ad)	26	26	0	0
PHM921(ad)	0	0	0	0
PHM930(ad)	3	3	0	0
PHM933(ad)	7	9	-2	-1
PHM934(ad)	0	0	0	0
PHM935A (ad)	9	21	-12	-3
PHM935B (ad)	231	217	14	-1
NabiSB0411	6	6	0	0
PHM903(ad)	6	10	-4	-1
PHM904(ad)	7	18	-11	-1
PHM906(ad)	137	0	137	1
PHM909(ad)	9	9	0	0
PHM910(ad)	35	18	17	1

PHM912(ad)	42	0	42	7
PHM914(ad)	0	146	-146	-1
PHM915(ind)	12	28	-16	-5
PHM917(ind)	36	>43	->7	->2
PHM918 (ad)	7	7	0	0
PHM923 (ay)	15	21	-6	-1
PHM924 (ad)	29	35	6	1
PHM925(ind)	8	14	-6	-1
PHM926(ind)	13	15	-2	-1
PHM927(ind)	4	7	-3	-1
PHM928 (ad)	9	9	0	0
PHM929 (ad)	14	18	-2	-1
PHM931(ind)	19	21	-2	-1
PHM932 (ad)	61	61	0	0
PHM935A (ad)	21	28	-7	-2
General	-----	-----	Sum = -13	-----
		Promedio	-13/30 = 0,4 días	-----

Resumen de la evaluación se todos los paneles de seroconversión usados:

Los resultados han demostrado que Elisa HBsAg es casi equivalente al ensayo de referencia. En promedio el ensayo Elisa HBsAg está solo 0,4 días más atrás en los 30 paneles de seroconversión usados en comparación con el ensayo de referencia.

5.12.3) Mutantes

1. Panel de mutantes

Se examinó un panel mutante prenuclear de hepatitis B de Teragenix, EE.UU. HBsAg Elisa puede detectar los resultados si la relación de la dilución del panel es 1:2 o 1:5.

Este panel consiste de 3 muestras de promotor del núcleo basal (A1762/G1764) tipo silvestre; Infección tipo silvestre, mutante precursor nuclear codón 28, de 4 muestras de promotor del núcleo basal (A1762/G1764) tipo silvestre; Mutante precursor nuclear codón 28, de 2 muestras de promotor del núcleo basal (T1762/A1754) infección mixta tipo silvestre MUTANTE (A1762/G1754).

2. Muestras mutantes

La tasa de detección de HBsAg Elisa es de 17/21 que es mejor que la del kit de referencia (14/21).

Mutación	HBsAg Elisa	Kit de referencia	Mutación	HBsAg Elisa	Kit de referencia
	Int	Int		Int	Int
113A114	positivo	positivo	C137W	positivo	negativo
P120L	positivo	positivo	C139Y	positivo	positivo
R122I	negativo	negativo	K141E	positivo	positivo
R122T	positivo	positivo	P142L/G145R	negativo	negativo
E122I	positivo	positivo	P142L	positivo	positivo
T123N	positivo	positivo	D144G	positivo	negativo
122RA123	negativo	negativo	G145K	positivo	negativo
C124R	negativo	negativo	C147T/C148T	positivo	positivo
T131I	positivo	positivo	E164D	positivo	positivo
T131P	positivo	positivo	S174N	positivo	positivo
Y134S	positivo	positivo			
Tasa de detección	8/11	8/11	Tasa de detección	9/10	6/10

5.12.4) 25 muestras frescas tomadas el mismo día

HBsAg Elisa detectó 25 muestras frescas tomadas el mismo día. Se cumplieron los preceptos del capítulo 3.1.9 del 2009/886/EC.

5.12.5) Sensibilidad analítica

Material estándar	Sensibilidad calculada
2º Estándar Internacional WHO*	0,03 IU/mL
Estándar PEI subtipo ad	0,08 PEI U/mL
Estándar PEI subtipo ay	0,09 PEI U/mL

* 2º Estándar Internacional WHO para HBsAg, subtipo adw2, genotipo A, código NIBSC: 00/588

5.12.6) Precisión

1) Repetibilidad intra-ensayo

La precisión intra-ensayo se determinó usando una muestra de control positivo y dos sueros de pacientes con distinta concentración de HBsAg (levemente por sobre el nivel de corte y a nivel medio) las que fueron analizadas en 20 repeticiones en un ensayo único por 3 días.

Ensayo	ID de muestra	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	PC 1 :32	0.7541	0.0857	11.36
1	PS 1 :32	2.2766	0.1571	6.90
1	PS 1 :64	1.3159	0.1168	8.88
2	PC 1 :32	0.9671	0.0358	3.70
2	PS 1 :32	2.7325	0.1025	3.75
2	PS 1 :64	1.5822	0.0888	5.61
3	PC 1 :32	0.9669	0.0909	9.40
3	PS 1 :32	2.6088	0.2367	9.07
3	PS 1 :64	1.6502	0.1499	9.08

El CV calculado varió entre 3,7% y 11,36 %. (= valor aceptable para un inmunoensayo que utiliza microplacas).

2) Reproducibilidad entre ensayos

Los experimentos de evaluación de la precisión se realizaron durante 10 días hábiles usando cinco muestras de suero (con niveles de HBsAg positivos limítrofes y claramente sobre el valor de corte).

ID de muestra	N	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
F1	10	0.0609	0.0185	30.41
F2	10	0.0770	0.0189	24.56
F3	10	0.1000	0.0245	24.51
F4	10	0.1786	0.0462	25.87
F5	10	0.6107	0.1412	23.12

Los CV calculados varían entre 30,4% para una muestra HBsAg negativa y 23,1 % para una muestra HBsAg positiva débil (= valores aceptables para la imprecisión entre ensayos de un inmunoensayo que utiliza microplacas).

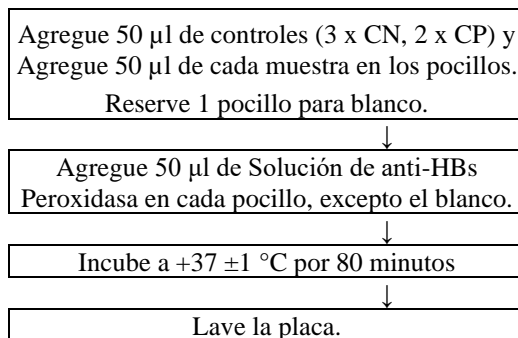
5.12.7) Exceso de Anticuerpo/Dosis alta Efecto de Gancho

Esto se llevó a cabo con una muestra de suero con una concentración muy alta de HBsAg de 125 mg/L en diluciones seriadas con el ensayo HBsAg ELISA de DIAsource. No se observó el efecto gancho por dosis alta.

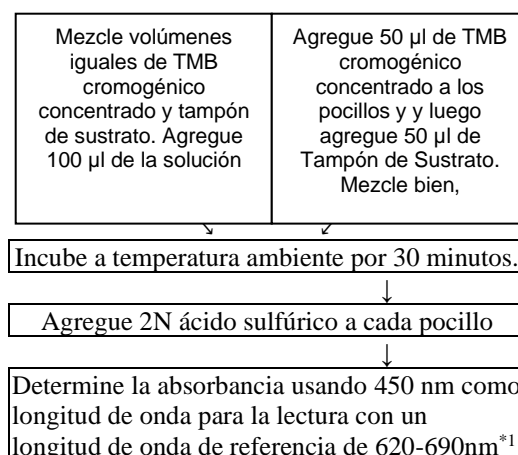
5.12.8) Seguimiento

El Calibrador Maestro HBsAg de DIAsource ha sido calibrado con el British Working Standard para HBsAg (Código NIBSC: 01/476-006) usando el ensayo **HBsAg ELISA**. La potencia relativa (razón) del British Working Standard para HBsAg versus el Calibrador Maestro HBsAg de DIAsource es 4,081 (3,853-4,325 Intervalo de Confianza 95%). La concentración del control positivo del ensayo **HBsAg ELISA** se ha determinado contra el Calibrador Maestro HBsAg de DIAsource y fue establecida en 42 IU/ml \pm 20%.

5.13) Diagrama de Flujo del Procedimiento del Ensayo



(Escoja uno de los dos métodos siguientes para general el color)



6) NOTAS

- *1 La longitud de onda de referencia del espectrofotómetro puede ser de 620nm a 690nm. Sin embargo el usuario debe validar el foto metro en conjunto con este kit antes de su uso.
- *2 Inactivación incompleta del virus de la hepatitis B después de tratamiento con calor a +60°C por 10 horas, J. Infect. Dis. 138:242-244.

7) BIBLIOGRAFIA

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A „new“ antigen in leukemia sera. JAMA, 1965;191:101- 106.
2. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970; 1: 695 - 698.
3. Aach RD, Grisham JW, Paker CW. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc Natl Acad Sci. USA 1971;68:1056-1060.
4. Kim CY, Tikes JG. Purification and biophysical characterization of hepatitis antigen. J Clin Invest. 1973; 52:1176-1186.
5. Wolters G. Kuijpers LP, Kacaki J, Schuurs AH, Enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen. J Infect. Dis 1977;136:Suppl 311-377.
6. Shih JW, Cote PJ Jr, Dapolito GM, Gerin JL. Production of monoclonal antibodies against hepatitis B surface antigen (HBsAg) by somatic cell hybrids. J Virol Methods. 1980;1:257-273.
7. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Semin Liver Dis. 1991;11:73-83

Fecha de revisión: **2020-02-24**