



Hepatitis B (HBsAg)

ELISA

Ensaio imunoenzimático (ELISA) de 3ª geração para a detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg)

SIGNIFICADO CLÍNICO

A hepatite B é uma doença viral caracterizada por um período prolongado de incubação (45-160 dias). O vírus causador desta patologia (HBV) é uma partícula composta por uma região interior o “core” onde se encontra o DNA e uma envoltura externa antigênica conhecida como antígeno de superfície (HBsAg). Sua presença no soro indica doença ativa. O Antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e seu correspondente anticorpo são específicos para infecções pelo vírus B. O Antígeno pode ser detectado no soro e secreções de pacientes em período agudo ou em infecções crônicas por HBV.

O HBsAg é geralmente a primeira evidência de infecção por HBV, que pode preceder em semanas ou meses a qualquer outra manifestação laboratorial ou aos sintomas e significados clínicos da doença. Pode ser que em alguns casos seja o único indicador de portadores assintomáticos em indivíduos com a hepatite B crônica.

A detecção do HBsAg é importante, portanto, não só para diagnóstico de doença aguda, mas também para o controle de portadores em bancos de sangue, unidades de diálise e áreas hospitalares onde exista a possibilidade de transmissão da infecção.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A amostra é colocada em contato com um anticorpo monoclonal anti HBs imobilizado sobre o suporte sólido. Se a amostra contém antígeno HBsAg, esta formará um complexo com os anticorpos e permanecerá unido ao suporte. A fração não unida é eliminada por lavagem depois de agregado outro anticorpo monoclonal anti HBs conjugado com peroxidase. Caso haja reação na primeira etapa do processo, esta se unirá ao conjugado. Depois de uma nova lavagem, se agrega o substrato enzimático. Nos casos em que o HBsAg esteja presente em uma amostra, haverá o desenvolvimento de cor para celeste. A reação é detida com o acréscimo de ácido sulfúrico, sendo que a cor celeste vira para amarela.

REAGENTES FORNECIDOS

Policubeta sensibilizada: policubetas de tiras removíveis com cavidades contendo anticorpo monoclonal anti HBs imobilizado.

Conjugado Concentrado: anticorpo monoclonal anti HBs conjugado com peroxidase.

Diluyente do Conjugado: Tampão Tris contendo aditivos e conservantes.

Revelador A: peróxido de hidrogênio 60 mmol/l em tampão citrato 50 mmol/l.

Revelador B: tetrametilbenzidina (TMB) 0,01 mol/l em ácido clorídrico 0,1 N.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Tampão de lavagem concentrado: cloreto de sódio 1,4 mmol/l em tampão fosfato 100 mmol/l e tensoativo não iônico 0,1 g/l.

Controle Positivo: diluição de soro inativado, reativo para HbsAg.

Controle Negativo: diluição de soro não reativo, inativado.

INSTRUÇÕES PARA USO

Tampão de Lavagem: sob baixas temperaturas, os componentes do reativo podem cristalizar. Neste caso, antes de diluir, colocar em banho maria a 37°C alguns minutos, misturando depois por inversão. Para usar, diluir 1 + 4 com água destilada (1 parte de Tampão de Lavagem concentrado + 4 partes de água destilada).

Policubeta Sensibilizada: pronta para uso.

Conjugado: antes de diluir, para o melhor aproveitamento do reagente, é conveniente centrifugar suavemente o conjugado concentrado para arrastar o que pode estar retido nas paredes do tubo. Preparar diluindo uma parte de conjugado concentrado + 50 partes de diluente de conjugado (ex: para uma tira colocar 20 ul de conjugado concentrado + 1 ml de diluente de conjugado ou quantidade equivalente).

Revelador A e B: pronto para uso.

Stopper: pronto para uso.

Controle Positivo e Controle Negativo: prontos para uso.

PRECAUÇÕES

- Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como potencialmente infectantes. Os controles encontram-se inativados. No entanto, devem ser usados como se tratando de material infectado.
- Os soros controles foram examinados para (HIV) encontrando-se negativos.
- Todos os materiais empregados no ensaio devem ser destruídos a fim de assegurar a inativação dos agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é autoclavar durante 1 hora a 121°C. Os líquidos de dejetos podem ser desinfetados com hipoclorito de sódio (concentração final 5%) durante no mínimo 60 minutos.
- Não misturar reagentes de diferentes kits e lotes.
- Não usar reagentes de outra origem.
- As policubetas devem ser incubadas em estufa. Não usar banho maria. Deve-se evitar abrir a estufa durante este processo.
- Evitar que vapores de hipoclorito, provenientes dos recipientes para dejetos biológicos ou outras fontes entrem

em contato com a policubeta, já que o hipoclorito afeta a reação.

- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- Evitar o contato do ácido sulfúrico (Stopper) com a pele, mucosas e os olhos. R36/38: irrita os olhos e a pele. R34: provoca queimaduras. S24/25: evitar o contato com os olhos e a pele. S26: caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com abundante água e acudir ao médico. S28: caso de contato com a pele, lavar imediatamente com abundante água. S37/39: utilizar luvas adequadas e proteção apropriadas para os olhos/cara.
- Evitar derramar os líquidos e a formação de aerossóis.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os Reagentes Fornecidos são estáveis sob refrigeração em temperatura (2-10°C) até a data do vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

Tampão de Lavagem: estável 3 meses a temperatura ambiente.

Policubeta sensibilizada: as tiras de cavidades com anticorpos imobilizado são fornecidas fechadas a vácuo e com dessecante. Não abrir o envoltório até o momento de uso, nem antes que esteja a temperatura ambiente, pois do contrário se favorecerá a umidade do conteúdo. As tiras de cubetas não utilizadas devem ser conservadas na embalagem com o dessecante, fechado com a fita auto adesiva e a 2-10°C. As tiras conservadas nestas condições podem ser utilizadas nos 5 meses posteriores desde que não se ultrapasse a data do vencimento do kit.

Conjugado: estável 24 horas sob refrigeração (2-10°C).

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta: obter a amostra de maneira usual. Não pode ser utilizada amostra inativada por calor.

b) Aditivos: caso seja utilizado plasma, poderá ser utilizado qualquer anticoagulante de uso corrente na prática transfusional.

c) Substâncias conhecidas que interferem: a hemólise, hiperlipemia e outras causas de turbidez podem provocar resultados errôneos. Estas amostras devem ser clarificadas por centrifugação.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: as amostras podem ser conservadas durante 7 dias a 2-10°C. Para conservação por períodos mais prolongados, as amostras devem ser congeladas a -20°C ou menos. Evitar os congelamentos e descongelamentos repetidos. Existem evidências que mostram que os congelamentos sucessivos podem ser causa de resultados errôneos.

Se as amostras precisarem ser transportadas, embalar de acordo com as especificações legais relativas ao envio de materiais infecciosos.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipetas capazes de medir os volumes indicados no PROCEDIMENTO.
- Relógio, alarme ou cronômetro.
- Estufa a 37°C.

- Material volumétrico adequado.

- Espectrofotômetro para leitura de policubetas (opcional).

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Calibração do Instrumento: zerar o espectrofotômetro com Branco de Reagente processado da mesma forma que uma determinação, mas omitindo a colocação da amostra e conjugado, ou seja, somente adicionar o Revelador A, Revelador B e Stopper.
- Comprimento de onda primária: 450 nm
- Comprimento de onda secundária (bicromática): 620 650 nm
- Tempo total de reação: 2 horas e 30 minutos
- Temperatura de Reação: 37°C e temperatura ambiente.
- Volume da Amostra: 100 ul.

PROCEDIMENTO

Nota: uma vez iniciado o procedimento, este deve ser finalizado sem interrupções.

Levar os reagentes e amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova. Processar simultaneamente 2 Controles Positivos (CP), 3 Negativos (CN) e os Desconhecidos (D). Nas cavidades a serem utilizadas da policubeta colocar:

	D	CP	CN
Amostra	100 ul	-	-
Controle Positivo	-	100 ul	-
Controle Negativo	-	-	100 ul

Para evitar a evaporação, cobrir a placa com uma fita adesiva e incubar em estufa por 60 minutos a 37°C. Após, aspirar cuidadosamente o líquido de cada cavidade, desprezando o em um recipiente para dejetos biológicos que contenha hipoclorito de sódio a 5%. Na continuação, lavar 5 vezes com Tampão de Lavagem empregando aproximadamente 350 ul/vez/cavidade. Após cada lavagem, o líquido deve ser descartado no recipiente com hipoclorito. Empregar lavador automático opcionalmente. Ao finalizar a última lavagem, eliminar completamente o líquido residual, invertendo a policubeta e batendo a várias vezes sobre papel absorvente, exercendo uma leve pressão com as mãos nas laterais maiores do suporte, para evitar que as tiras se soltem do suporte. Em seguida, adicionar em cada cavidade:

Conjugado	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

Misturar aplicando suaves golpes nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Para evitar a evaporação, cobrir a placa com uma fita adesiva e incubar em estufa por 60 minutos a 37°C. Após, eliminar o líquido de cada cavidade, desprezando o em um recipiente para dejetos biológicos que contenha hipoclorito de sódio a 5% e lavar de acordo com o indicado mais acima. Ao finalizar a última lavagem, eliminar completamente o líquido residual, invertendo a policubeta e batendo a várias vezes sobre papel absorvente, exercendo uma leve pressão com as mãos nas laterais maiores do suporte, para evitar que

as tiras se soltem do suporte. Em seguida, adicionar em cada cavidade:

Revelador A	1 gota	1 gota	1 gota
Revelador B	1 gota	1 gota	1 gota

Caso seja utilizada micropipeta automática, dispensar 50 ul. Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Incubar durante 30 minutos em temperatura ambiente e logo adicionar:

Stopper	1 gota	1 gota	1 gota
----------------	--------	--------	--------

Caso seja utilizada micropipeta automática, dispensar 50 ul. Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Ler em espectrofotômetro a 450 nm ou efetuar leitura bicromática a 450/620 650 nm ou avaliar os resultados visualmente por comparação com os controles Positivos e Negativos.

ESTABILIDADE DA MISTURA FINAL DE REAÇÃO

A cor da reação é estável durante 30 minutos, portanto os resultados devem ser observados dentro deste período.

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DA CORRIDA

A prova é considerada válida se cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

- A leitura de pelo menos 2 dos 3 Controles Negativos corrigidas contra o Branco de Reativos devem ser menores ou iguais a 0,150 D.O.
- A leitura média dos controles Positivos corrigida deve ser maior ou iguais a 0,600 D.O.
- A leitura do branco deve ser maior a -0,020 e menor a 0,020 D.O.

Se uma ou mais destas condições não se cumprirem, repetir a prova. Lembrar que as leituras obtidas dependerão da sensibilidade do equipamento empregado.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

a) Com instrumento óptico

A reatividade da amostra é determinada relacionando a absorbância da amostra em relação ao valor do Cut off.

Cut off = CN + 0,060 D.O.

Onde: CN: média das leituras dos Controles Negativos

Amostras reativas: são consideradas aquelas com absorbância maior ou igual ao valor cut off. As amostras inicialmente reativas devem ser analisadas novamente em duplicata com o mesmo método antes de sua interpretação definitiva. Se uma ou ambas as duplicatas resultarem reativas, a amostra deve ser considerada repetidamente reativa.

Amostras não reativas: são consideradas aquelas com absorbância menor que o valor cut off.

b) Interpretação visual

Quando a opção for por este tipo de interpretação, deve ser considerada amostra não reativa aquela que não apresentar uma coloração maior que as dos Controles Negativos. Pelo

contrário, uma amostra claramente amarela é considerada reativa. Cores tênues maiores que do Controle Negativo requer a interpretação instrumental.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO:

Vide substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. Constituem causas de resultados errôneos:

- Lavagem incorreta das cubetas de reação;
- Contaminação cruzada de amostras Não reativas com antígeno procedente de uma amostra reativa;
- Contaminação da solução cromógena com agentes oxidantes (cloro, etc.);
- Contaminação do Stopper;
- Falta de homogeneização das amostras com o conjugado;
- Conservação inadequada das tiras de cubetas não utilizadas;
- Uso de banho maria no lugar da estufa para a incubação.
- Contaminação do Tampão de Lavagem diluído. Recomenda-se conferir a limpeza dos frascos onde é preparado e armazenado. Se for observada turbidez ou precipitação na preparação, desprezê-lo.

Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição à infecção pelo HBV.

Ocasionalmente, ao realizar leituras bicromáticas, podem ser obtidas absorbâncias negativas que não invalidam a determinação. Isto se deve ao fato de que algumas amostras resultam em leituras inferiores ao Branco de Reativos. Certifique-se de que o sistema de lavagem que está sendo usado aspire totalmente o conteúdo e que a altura da solução de lavagem dispensada seja regular até a borda da cavidade.

DESEMPENHO

a) Sensibilidade: utilizando o International Standard for Hepatitis B Surface Antigen (subtype ad) NIBSC (cód. 80/549) diluído em PBS BSA 5%, azida sódica 0,1% foi detectado quantidades de antígeno de 0,5 UI/ml. Segundo o informe do WHO Working Group on International Reference Preparations, 1 UI é equivalente a 0,58 unidades PEI (Paul Erlich Institut) ou 1,93 French "ng" ou 5,59 Abbott "ng".

b) Especificidade: foram realizados diferentes estudos em uma população de indivíduos hospitalizados e ambulatorios provenientes de centros de saúde da cidade de Rosário, Argentina. Nos mesmos se comparou a especificidade do método com outros de similar princípio de reação, obtendo-se os seguintes resultados:

- Estudo nº 1: foram analisados 85 indivíduos obtendo-se uma especificidade de 100%
- Estudo nº 2: foram analisados 76 indivíduos obtendo-se uma especificidade de 98,7%
- Estudo nº 3: foram analisados 127 indivíduos obtendo-se uma especificidade de 100%

c) Estudo Populacional: em uma população geral que inclui indivíduos sadios e doentes, a correlação com respeito a outros ensaios disponíveis no mercado foi de 99,8%.

APRESENTAÇÃO

Kit para 96 determinações (Cód. 1483253).

Kit para 192 determinações (Cód. 1483256).

REFERÊNCIAS

- Wisdom, G.B. - Clin. Chem. 22/8:1243, 1976.
- Engvall, E. - Methods Enzymol. 70:419, 1980.
- Gerety, R.J. - "Hepatitis B" - Academic Press, Inc., USA, 1985.
- García Solís - Análisis Clínicos 24/6:199, 1981.
- Toplikar, E.; Carlomagno, A.; Capriotti, G.; Rojkin, F.; Lorenzo, L. - Rev. Arg. de Transfusión XVII/4:239, 1991.
- Rojkin, F.; Gariglio, R.; Toplikar, E.; Carlomagno, A.; Lorenzo, L. - Proceedings, 5th National Forum on AIDS, Hepatitis and other Blood-Borne Diseases, Atlanta, Georgia, USA, pág. 89, 1992.
- Toplikar, E.; Carlomagno, A.; Rojkin, F.; Gariglio, R.; Lorenzo, L. - J. Clin. Lab. Anal. 7/6:324, 1993.
- Barbara, J. - Vox Sang. 65:249-250, 1993.
- WHO Working Group on International Reference Preparations for Testing Diagnostic Kits used in the Detection of HBsAg and anti-HCV Antibodies. Geneva, SW 6-7 October 2003.

EXPLIÇÃO DOS SÍMBOLOS

Policubeta	Sensib.	Diluyente	Conj.
Policubeta sensibilizada		Diluyente de Conjugado	
Conjugado	Conc.	Buf. Lavado	Conc.
Conjugado Concentrado		Tampão de Lavagem Concentrado	
Revelador	A	Revelador	B
Revelador A		Revelador B	
Control	+	Control	-
Controle Positivo		Controle Negativo	
Stopper			
Stopper			

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia
IVD	Uso médico-diagnóstico "in vitro"
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data de validade
	Limite de temperatura (conservar a)
	Não congelar
	Risco biológico
	Volume após da reconstituição
Cont.	Conteúdo
LOT	Número de lote
	Elaborado por:
	Nocivo
	Corrosivo / Caústico
	Irritante
	Consultar as instruções de uso
Calibr.	Calibrador
CONTROL	Controle
CONTROL +	Controle Positivo
CONTROL -	Controle Negativo
REF	Número de catálogo



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina