



Sclavo-EIA HBsAg

Ref ELI901001

Istruzioni d'uso

Rev.E ELI901001-05-2022



Sclavo Diagnostics International
Loc. Pian dei Mori, via Po n° 26-28 • 53018 (SI) (Italy)
Phone +39 0577 390 41 • Fax +39 0577 390 444
www.sclavodiagnostics.com

A. USO CONSIGLIATO

Sclavo-EIA HBsAg è un kit ELISA di 4° generazione con metodi "one-step" per la rilevazione dell'antigene di superficie del virus dell'Epatite B (HBsAg) nel plasma e siero umani.

Questo kit è in grado di rilevare anche varianti virali e può essere usato per lo screening di campioni di donatori di sangue nelle banche del sangue e per il follow-up di pazienti con infezione da virus dell'epatite B (HBV) nei laboratori diagnostici.

B. INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite B, membro della famiglia *Hepadnaviridae*, è un piccolo virus a DNA a doppio filamento circolare, con un marcato tropismo per gli epatociti, che causa epatite transitoria e cronica. Le infezioni transitorie possono causare malattie gravi in una piccola frazione di soggetti con epatite fatale e fulminante. Le infezioni croniche possono anche avere gravi conseguenze: quasi il 25% sfocia in un cancro al fegato non trattabile.

Si stima che da 250 a 350 milioni di persone siano cronicamente infette da HBV in tutto il mondo, con una prevalenza globale del 3,9%. Circa 2 miliardi di persone hanno evidenza sierologica di infezione da HBV passata o presente.

L'HBV si trasmette attraverso l'esposizione al sangue infetto e ai fluidi corporei (in particolare lo sperma e le secrezioni vaginali). La maggior parte delle nuove infezioni in tutto il mondo vengono acquisite verticalmente alla nascita (infezione perinatale), orizzontalmente attraverso la trasmissione tra bambini al di sotto dei 5 anni, tramite contatti sessuali ad alto rischio, condivisione di siringhe infette tra tossicodipendenti per via endovenosa e sangue o prodotti sanguigni contaminati e pratiche mediche non sicure.

L'antigene di superficie dell'epatite B o HBsAg è la proteina più importante dell'involucro del virus dell'epatite B.

L'antigene di superficie contiene il determinante "a", comune a tutti i sottotipi virali noti, immunologicamente distinto da due sottogruppi distinti (ay e ad).

L'HBsAg può essere rilevato già 1-2 settimane o fino a 11-12 settimane dopo l'esposizione e la sua persistenza è un indicatore di cronicità.

La capacità di rilevare l'HBsAg con test immunologici ad alta sensibilità negli ultimi anni ha portato a comprenderne la distribuzione e l'epidemiologia in tutto il mondo e a ridurre radicalmente il rischio di infezione trasfusionale.

C. PRINCIPIO DEL METODO

La fase solida (pozzetti per microtitolazione) viene sensibilizzata con una miscela di anticorpi monoclonali murini diretti contro i determinanti "a", "d" e "y" di HBsAg (anticorpo di cattura). Il campione del paziente (siero/plasma) e una seconda miscela di anticorpi monoclonali di topo, coniugati con perossidasi (HRP) e diretti contro un diverso epitopo del determinante "a" e contro "preS" vengono aggiunti insieme nel pozzetto della microtitolazione. Se HBsAg è presente nel campione, farà da ponte tra gli anticorpi di cattura nella fase solida e il coniugato HRP. Al termine dell'incubazione "one-step", i micropozzetti vengono lavati per rimuovere le proteine del siero / plasma non legate e il coniugato HRP in eccesso.

Dopo la fase di lavaggio, il coniugato policlonale anti-IgG e gli anti IgM umane vengono aggiunte al pozzetto da microtitolazione. Se gli anticorpi sono stati catturati dagli antigeni ricombinanti, il coniugato si legherà al pozzetto della microtitolazione.

La presenza dei complessi anticorpi di cattura HBsAg-coniugato HRP viene rivelata aggiungendo il substrato incolore TMB per avviare la reazione colorimetrica. Il colore che si sviluppa è proporzionale alla quantità di HBsAg legato alla fase solida.

D. COMPONENTI DEL KIT E LORO PREPARAZIONE

Il kit è per 96 test e contiene i seguenti materiali.

Micropiastra

MICROPIASTRA

12 strisce x 8 pozzetti rivestiti con anticorpi monoclonali di topo purificati per affinità Anti-HBsAg, specifici per i determinanti "a", "y" e "d" in una busta richiudibile con sacchetto essiccante.

Equilibrare la micropiastra a temperatura ambiente (1 ora) prima di aprire la busta. Se l'indicatore di umidità (sacchetto essiccante) è diventato verde scuro, non utilizzare la micropiastra.

Riporre le strisce inutilizzate nella busta richiudibile con l'indicatore di umidità, premere per rimuovere l'aria, chiudere saldamente la busta e conservare a 2-8°C.

Dopo la prima apertura, le strisce possono essere utilizzate fino a quando l'indicatore di umidità nel sacchetto non è virato da giallo a verde.

Controllo negativo

CONTROLLO -



GHS07

1 fialone x 2 ml. Pronto all'uso. Codice colore: giallo paglierino. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Tampone fosfato 10 mM pH 7,4 contenente siero di capra. Conservanti: sodio azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Avvertenza: ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364, P333+P313; P321; P501)

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

Controllo positivo**CONTROLLO +****GHS07**

1 flacone x 2 ml. Pronto all'uso. Codice colore: verde. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.
Tampone fosfato 10 mM pH 7,4 contenente siero di capra e HBsAg ricombinante non infettivo. Conservanti: gentamicina solfato (0,02%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Avvertenza: ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364, P333+P313; P321; P501)

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

Calibratore**CAL****GHS07**

1 flacone. Liofilizzato. Da ricostituire con il volume di acqua di grado EIA riportato in etichetta. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

HBsAg ricombinante non infettivo a 0,5 UI / ml (secondo standard internazionale dell'OMS per HBsAg, codice NIBSC 00/588) in tampone fosfato 10 mM pH 7,4. Conservanti: gentamicina solfato (0,02%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Importante: una volta ricostituito, il calibratore non è stabile. Preparare aliquote e conservare a -20 °C per 7 giorni.

Avvertenza: ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364, P333+P313; P321; P501)

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

Tampone di lavaggio concentrato**WASHBUF 20X****GHS09****GHS07**

1 bottiglia x 60 ml. Concentrato 20 volte. Portare al volume finale di 1200 ml utilizzando acqua di grado EIA.
Una volta diluito, contiene tampone fosfato 10 mM pH 7,0, Tween 20 0,5%, Na-azide (0,09%) e Proclin™ 300 (0,045%).
Verificare attentamente che non vi siano cristalli di sale non disciolti, se necessario mescolare fino a completa dissoluzione.

Importante: evitare la formazione di schiuma durante la risospensione in quanto potrebbe dare origine a falsi risultati.

Importante: una volta ricostituito, il tampone pronto per l'uso è stabile 1 settimana a 2-8 °C.

Avvertenza: ATTENZIONE - Sensibilizzante / Pericoloso per l'ambiente (H317; H411; P101; P102; P103; P261; P273; P280; P333+P313; P321; P501).

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

Diluyente Coniugato-HRP**CONJ DIL****GHS07**

1 flacone x 16 ml. Pronto all'uso. Codice colore: rosa / rosso. Mescolare delicatamente prima dell'uso.
Tampone fosfato 10 mM pH 7,4 contenente siero di topo e 5% di BSA. Conservanti: gentamicina solfato (0,02%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Avvertenza: ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364, P333+P313; P321; P501)

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

Coniugato**CONJ 20X****GHS07**

1 flacone x 0,8 ml. 20 volte concentrato. Da ricostituire con il diluyente coniugato-HRP. Dopo la ricostituzione, agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

Anticorpi monoclonali di topo marcati con perossidasi (HRP) contro HBsAg, determinante "a" e "preS", tampone Tris 10 mM pH 6,8 +/- 0,1, 5% BSA. Conservanti: gentamicina solfato (0,02%) e Proclin™ 300 (0,045%).

Importante: la soluzione di lavoro non è stabile. Prepara solo il volume necessario per il lavoro della giornata. Ad esempio, diluire 0,1 ml di coniugato 20X con 1,9 ml di diluyente coniugato-HRP in una fiala di plastica usa e getta e miscelare accuratamente prima dell'uso.

Avvertenza: ATTENZIONE - Sensibilizzante (H317; P261; P280; P362+P364, P333+P313; P321; P501)

Contiene reaction mass of 5-chloro-2-methyl-4-iso-thiazolin-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CAS 55965-84-9)

Substrato **SUBS TMB**

1 flacone x 25 ml. Pronto all'uso. Agitare accuratamente su vortex prima dell'uso.

0,03% di tetrametilbenzidina (TMB), 4% di dimetilsolfossido e 0,02% di perossido di idrogeno (H₂O₂) stabilizzati in tampone citrato 50 mM (pH 3,8).

Importante: non esporre a forti illuminazioni, agenti ossidanti (es. Fumi di ipoclorito), superfici metalliche; conservare al riparo dalla luce.

Acido solforico **H₂SO₄ 0.3 M**



GHS05

1 flacone x 25 ml. Pronto all'uso. Mescolare per inversione prima dell'uso.

Soluzione 0.3 M H₂SO₄.

Avvertenza: PERICOLO - Corrosivo (H314; P303+P361+P353; P305+P351+P338; P310; P321; P405; P501).

Contiene Acido Solforico (CAS 7664-93-9)

Legenda:

Dichiarazioni di avvertenza H:

H314 – Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H317 – Può provocare una reazione allergica cutanea.

H411 – Tossico per gli organismi acquatici con effetti a lunga durata.

Dichiarazioni precauzionali P:

P101 - In caso di consultazione di un medico, tenere a disposizione il contenitore o l'etichetta del prodotto.

P102 - Tenere fuori dalla portata dei bambini.

P103 - Leggere attentamente e seguire tutte le istruzioni

P261 - Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia / i vapori/ gli aerosol.

P273 - Non disperdere nell'ambiente.

P280 - Indossare guanti di protezione.

P310 - Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P321 - Trattamento specifico (vedere su questa etichetta)

P303+P361+P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.

P305+P351+P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364 - Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

P405 - Conservare sotto chiave.

P501 - Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità con le disposizioni locali / regionali / nazionali / internazionali.

Pellicole adesive per coprire la micropiastra **2**

Libretto istruzioni per l'uso **1**

E. Materiali necessari ma non forniti

Vetreteria da laboratorio: cilindri graduati, pipette, ecc. di dimensioni adeguate.

Micropipette monocanale regolabili in grado di erogare 50 µL, 100 µL e 200 µL e puntali in plastica monouso.

Acqua distillata di grado EIA.

Letto di micropozzetti a doppia lunghezza d'onda in grado di leggere a 450 nm con un filtro di riferimento di 620 - 630 nm.

Se il filtro di riferimento non è disponibile, assicurarsi che il fondo dei pozzetti della microtitolazione sia pulito (non toccare senza guanti).

Incubatore a 37 ° C ± 1 ° C (a secco o umidificato).

Lavatore ELISA multicanale calibrato.

Agitatore a vortice o simile.

Timer.

Carta assorbente per asciugare la micropiastra.

F. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

1. Il kit deve essere utilizzato solo da personale tecnico qualificato e adeguatamente formato, sotto la supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Quando il kit è utilizzato per lo screening di unità ematiche ed emocomponenti, deve essere utilizzato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale del settore (Ministero della Salute o entità simile) per effettuare questo tipo di analisi.
3. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti privi di talco e occhiali. Evitare l'uso di dispositivi affilati (aghi) o taglienti (lame). Tutto il personale coinvolto deve essere formato nelle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Tutto il personale coinvolto nella manipolazione dei campioni deve essere vaccinato per HBV e HAV, i cui vaccini sono disponibili, sicuri ed efficaci.
5. L'ambiente del laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come polvere o agenti microbici presenti nell'aria, quando si aprono le fiale del kit e le micropiastre e durante l'esecuzione del test. Proteggere il cromogeno / substrato dalla luce intensa ed evitare le vibrazioni della superficie del banco su cui viene eseguito il test.
6. Al ricevimento, conservare il kit a 2-8°C in un frigorifero o in una cella frigorifera a temperatura controllata.
7. Dopo apertura, la stabilità dei singoli reagenti è quella riportata nella sezione D
8. Non scambiare componenti tra lotti diversi dei kit. Si raccomanda di non scambiare i componenti tra due kit dello stesso lotto.
9. Verificare che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti o aggregati visibili. In caso contrario, consigliare al supervisore del laboratorio di avviare le procedure necessarie per la sostituzione del kit.
10. Evitare la contaminazione incrociata tra campioni di siero / plasma utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione. Non riutilizzare le punte usa e getta.
11. Evitare la contaminazione incrociata tra i reagenti del kit utilizzando puntali monouso e cambiandoli tra l'uso di ciascuno di essi. Non riutilizzare le punte usa e getta.
12. Non utilizzare il kit integro dopo la data di scadenza indicata sul contenitore esterno e sulle etichette interne (flaconcini).
13. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di siero umano devono essere manipolati al livello di biosicurezza 2, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, Stati Uniti, in conformità a quanto riportato nella pubblicazione dell'Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. Si raccomanda l'uso di utensili monouso in plastica nella preparazione dei componenti liquidi o nel trasferimento dei componenti in postazioni di lavoro automatizzate, al fine di evitare contaminazioni incrociate.
15. I rifiuti prodotti durante l'uso del kit devono essere smaltiti in conformità alle direttive e leggi nazionali relative ai rifiuti di laboratorio di sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalla procedura di lavaggio, dai residui dei controlli e dai campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima di essere smaltiti. Le procedure di inattivazione suggerite sono il trattamento con una concentrazione finale del 10% di candeggina per uso domestico per 16-18 ore o l'inattivazione termica in autoclave a 121°C per 20 minuti.
16. Fuoriuscite accidentali da campioni e operazioni devono essere adsorbite con fazzoletti di carta imbevuti di candeggina domestica e poi con acqua. I fazzoletti devono quindi essere eliminati in contenitori appropriati designati ai rifiuti di laboratorio/ospedale.
17. L'acido solforico è un irritante. In caso di fuoriuscite, lavare la superficie con abbondante acqua.
18. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (esempio: puntali usati per campioni e controlli, micropiastre usate) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti secondo le direttive nazionali e le leggi relative ai rifiuti di laboratorio.

G. CAMPIONE: TIPO, PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue viene prelevato in modo asettico mediante prelievo venoso e il plasma o il siero vengono preparati utilizzando le tecniche standard di preparazione dei campioni per le analisi cliniche di laboratorio. L'uso di anticoagulanti come citrato, EDTA ed eparina non interferisce con il test.
2. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni; in particolare sodio azide poiché questa sostanza chimica influirebbe sull'attività enzimatica del coniugato, generando risultati falsi negativi.
3. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati. Quando il kit viene utilizzato per lo screening delle unità di sangue, l'etichettatura con codice a barre e la lettura elettronica sono fortemente raccomandate.
4. I campioni emolizzati (rossastri) e visibilmente fortemente lipemici ("lattiginosi") devono essere scartati in quanto potrebbero generare falsi risultati. I campioni contenenti residui di fibrina o particelle pesanti o filamenti e corpi microbici devono essere scartati in quanto potrebbero dare origine a falsi risultati.
5. I sieri ed il plasma possono essere conservati a 2°-8°C in provette di raccolta primaria per un massimo di cinque giorni dopo la raccolta.

Non congelare le provette di raccolta primaria. Per periodi di conservazione più lunghi, i campioni di siero e plasma, accuratamente rimossi dalla provetta di raccolta primaria, possono essere conservati congelati a -20°C secondo le procedure di conservazione dei campioni validate dal Laboratorio. I campioni congelati non devono essere congelati / scongelati più di una volta poiché ciò potrebbe generare particelle che potrebbero influenzare il risultato del test.

6. Se sono presenti particelle, centrifugare a 2.000 rpm per 20 minuti o filtrare utilizzando filtri da 0,2 - 0,8 micron per chiarificare il campione per il test.

H. STRUMENTI UTILIZZATI IN ABBINAMENTO AL KIT

1. Le micropipette devono essere calibrate per dispensare il volume corretto richiesto dal test e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcol domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti ospedalieri) di quelle parti che potrebbero entrare accidentalmente in contatto con il campione. Dovrebbero inoltre essere regolarmente mantenute per mostrare una precisione dell'1% e una veridicità del +/-2%. Anche la decontaminazione delle fuoriuscite o dei residui dei componenti del kit deve essere eseguita regolarmente.
2. L'incubatore ELISA deve essere impostato a +37°C (tolleranza di +/-0,5°C) e controllato regolarmente per garantire il mantenimento della temperatura corretta. Sia gli incubatori a secco che i bagnomaria sono adatti per le incubazioni, a condizione che lo strumento sia validato per l'incubazione dei test ELISA.
3. In caso di agitazione durante l'incubazione, lo strumento deve garantire 350 rpm +/- 150. L'ampiezza dell'agitazione è molto importante in quanto se fosse sbagliata potrebbe dare origine a schizzi e quindi a qualche risultato falso positivo.
4. Il lavatore ELISA è estremamente importante per le prestazioni complessive del test. Il lavatore deve essere accuratamente convalidato in anticipo, controllato per l'erogazione del giusto volume di erogazione e regolarmente sottoposto a manutenzione secondo le istruzioni per l'uso del produttore. In particolare il lavatore, al termine del carico di lavoro quotidiano, deve essere ampiamente ripulito dai sali con acqua deionizzata. Prima dell'uso, il lavatore deve essere ampiamente pretrattato con la soluzione di lavaggio diluita. Lo strumento deve essere sottoposto settimanalmente a decontaminazione secondo il suo manuale (si consiglia la decontaminazione NaOH 0,1 M). Cinque (5) cicli di lavaggio (aspirazione + dispensazione di 350µl / pozzetto di soluzione di lavaggio + 20 sec di attesa = 1 ciclo) sono sufficienti per garantire l'analisi con le prestazioni dichiarate. Se l'attesa non è possibile fare un ciclo di lavaggio in più. Un ciclo di lavaggio errato o aghi bloccati dal sale sono le principali cause di reazioni false positive.
5. I tempi di incubazione hanno una tolleranza del +/- 5%.
6. Il lettore di micropiastre ELISA deve essere dotato di un filtro di lettura di 450nm e di un secondo filtro di 620-630nm, obbligatorio per scopi di blanking. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) larghezza di banda <10 nm; (b) intervallo di assorbanza da 0 a > 2,0; (c) linearità fino a > 2,0; (d) ripetibilità > 1%. Il blanking viene eseguito sul pozzetto identificato nella sezione "Procedura di analisi". Il sistema ottico del lettore deve essere calibrato regolarmente per garantire che venga misurata la densità ottica corretta. Deve essere sottoposto a regolare manutenzione secondo le istruzioni del produttore.
7. Quando si utilizza una stazione di lavoro automatizzata ELISA, tutti i passaggi critici (dispensazione, incubazione, lavaggio, lettura, gestione dei dati) devono essere attentamente impostati, calibrati, controllati e sottoposti a regolare manutenzione al fine di corrispondere ai valori riportati nella sezione O "Controllo di qualità interno". Il protocollo del test deve essere installato nel sistema operativo dell'unità e convalidato come per il lavatore ed il lettore. Inoltre, la parte della stazione di manipolazione dei liquidi (dispensazione e lavaggio) deve essere convalidata e impostata correttamente. Particolare attenzione deve essere posta per evitare eventi di trascinarsi negli aghi utilizzati per l'erogazione e per il lavaggio. Questo deve essere studiato e controllato per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione dei pozzetti adiacenti. L'utilizzo di stazioni di lavoro automatiche ELISA è consigliato per lo screening del sangue quando il numero di campioni da analizzare supera le 20-30 unità per analisi.

- Quando si utilizzano dispositivi automatici, nel caso in cui il supporto del flaconcino dello strumento non si adatti ai flaconcini forniti nel kit, trasferire la soluzione in contenitori appropriati ed etichettarli con la stessa etichetta staccata dal flaconcino originale. Questa operazione è importante per evitare che il contenuto delle fiale non corrisponda durante il trasferimento. Al termine del test, riportare i contenitori etichettati secondari a 2°-8°C, ben chiusi.

I. CONTROLLI E OPERAZIONI PRELIMINARI

- Verificare la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta esterna della confezione del kit. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata.
- Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili ad occhio nudo. Verificare che il cromogeno / substrato sia incolore o blu pallido aspirandone un piccolo volume con una pipetta di plastica trasparente sterile. Verificare che non ci siano state rotture durante il trasporto e che non siano presenti fuoriuscite di liquido all'interno della scatola. Verificare che la busta in alluminio, contenente la micropiastra, non sia forata o danneggiata.
- Diluire tutto il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
- Diluire il coniugato-HRP concentrato 20X con il suo diluente come descritto sopra.
- Disciogliere il calibratore come descritto sopra.
- Lasciare che tutti gli altri componenti raggiungano la temperatura ambiente (circa 1 ora) e poi mescolare come descritto.
- Impostare l'incubatore ELISA a +37°C e preparare il lavatore ELISA pretrattandolo con la soluzione di lavaggio diluita, secondo le istruzioni del produttore. Impostare il giusto numero di cicli di lavaggio come riportato nell'apposita sezione.
- Verificare che il lettore ELISA sia stato acceso almeno 20 minuti prima della lettura.
- Se si utilizza una stazione di lavoro automatizzata, accenderla, controllare le impostazioni e assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
- Verificare che le micropipette siano impostate sul volume richiesto.
- Verificare che tutte le altre apparecchiature siano disponibili e pronte all'uso.
- In caso di problemi, non procedere oltre con il test e avvisare il supervisore.

J. PROCEDIMENTO

Il test deve essere eseguito secondo quanto riportato di seguito, è importante mantenere lo stesso tempo di incubazione per tutti i campioni in prova.

Nota importante: Il prelavaggio (1 ciclo: erogazione 350 µl / pozzetto di soluzione di lavaggio + aspirazione) è fondamentale per ottenere risultati affidabili e specifici sia nelle procedure manuali che in quelle automatiche. Non omettere questo passaggio!

Analisi automatizzata:

Seguire il manuale utente del sistema ELISA automatizzato per programmare il metodo di test Sclavo-EIA HBsAg.

Nel caso in cui il test venga eseguito in modo automatizzato, si consiglia di far aspirare allo strumento prima 150 µl di calibratore e controlli positivi e negativi, poi 150 µl di ogni campione e infine 100 µl di Coniugato Enzimatico diluito.

Prima di aspirare il campione successivo, gli aghi devono essere debitamente lavati per evitare qualsiasi contaminazione incrociata tra i campioni.

Si raccomanda vivamente di verificare che il tempo intercorso tra la dispensazione del primo e dell'ultimo campione venga calcolato dallo strumento e preso in considerazione ritardando di conseguenza la prima operazione di lavaggio.

Per la fase di prelavaggio (punto 1 della procedura di prova) e per tutte le operazioni successive seguire le istruzioni operative riportate di seguito per l'analisi manuale.

Analisi manuale:

1. Posizionare il numero richiesto di strip da 8 nella cornice dei micropozzetti in funzione del n° di campioni da analizzare. Identificare le strip e lavare una volta per idratare bene. Identificare attentamente i pozzetti per controlli, calibratore e campioni.
2. Lasciare il primo pozzetto (A1) vuoto per il bianco.
3. Dispensare 150 µl di controllo negativo in triplicato, 150 µl di calibratore in duplicato, 150 µl di controllo positivo in singolo seguito da 150 µl in singolo per ciascun campione nei pozzetti appropriati.
Non diluire i controlli e il calibratore poiché sono prediluiti, pronti per l'uso!

Nota importante: verificare la presenza di campioni nei pozzetti ad occhio nudo (c'è una marcata differenza di colore tra pozzetti vuoti e pieni) o leggendo a 450 / 620nm. (i campioni mostrano valori OD superiori a 0,100).

4. Pipettare 100 µl di coniugato enzimatico in ogni pozzetto, eccetto nel primo pozzetto (A1), e coprire con la pellicola adesiva.

Nota importante: Fare attenzione a non toccare la superficie interna in plastica del pozzetto con la punta riempita con il coniugato enzimatico. Potrebbe verificarsi contaminazione.

5. Dopo l'aggiunta del coniugato, controllare che il colore dei campioni sia cambiato da giallastro a rosa / rosso. Incubare la micropiastra per 120 min a +37°C.
6. Lavare la micropiastra con un lavatore automatico erogando e aspirando 350 µl / pozzetto di soluzione di lavaggio diluita come riportato in precedenza (sezione H.4).
7. Pipettare 200 µl di miscela di cromogeno / substrato in ogni pozzetto, compreso il pozzetto del bianco (A1). Quindi incubare la micropiastra a temperatura ambiente (18-24°C) per 30 minuti.

Nota importante: Non esporre a una forte illuminazione diretta: potrebbe generarsi un risultato falso.

8. Pipettare 100 µl di acido solforico in tutti i pozzetti utilizzando la stessa sequenza di pipettaggio del passaggio 7 per arrestare la reazione enzimatica. L'aggiunta di acido farà virare il controllo positivo e i campioni positivi da blu a giallo / marrone.
9. Misurare l'intensità del colore della soluzione in ogni pozzetto, come descritto nella sezione H.6, utilizzando un filtro da 450 nm (lettura) e da 620-630 nm (sottrazione dello sfondo), oscurando lo strumento su A1 (obbligatorio).

Note importanti:

1. Assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo del micropozzetto prima della lettura. Le impronte digitali potrebbero generare risultati falsi positivi alla lettura.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque non oltre 20 minuti dalla sua aggiunta. Può verificarsi una certa autoossidazione del cromogeno che porta ad un elevato background.
3. Quando i campioni da testare non sono sicuramente puliti o sono stati conservati congelati, si consiglia la procedura di prova sotto riportata in quanto molto meno sensibile alle interferenze dovute a emolisi, iperlipemia, contaminazione batterica e microparticelle di fibrina. La prova viene eseguita in due fasi a +37°C in agitazione a 350 rpm +/- 150 come segue:
 - dispensare 100 µl di controlli, calibratore e campioni;
 - incubare 60 min a +37°C con agitazione;
 - lavare secondo le istruzioni;
 - dispensare 100 µl di tracciante enzimatico diluito;
 - incubare 30 min a + 37 ° C con agitazione;
 - lavare secondo le istruzioni;
 - dispensare 100 µl di substrato;
 - incubare 30 minuti a R.T. con agitazione;
 - fermare e leggere.

• In questa procedura è possibile omettere il prelavaggio. Questo metodo mostra prestazioni simili a quello standard e quindi può essere utilizzato in alternativa.

4. Il calibratore (CAL) non influisce sul calcolo del cut-off e quindi sul calcolo dei risultati del test. Il calibratore può essere utilizzato solo quando è richiesto un controllo di qualità interno del Laboratorio CQ.

K. SCHEMA DEL TEST

Operazioni	Procedura
Fase di prelavaggio	n°1 ciclo
Controlli, calibratore, campioni coniugato enzimatico diluito	150 µl 100 µl
1° incubazione	120 min
Temperatura	+37°C
Fase di lavaggio	n°5 cicli con 20" di attesa OPPURE n°6 cicli senza attesa
Cromogeno/Substrato	200 µl
2° incubazione	30 min
Temperatura	ambiente
Acido solforico	100 µl
Letture OD	450nm / 620-630nm

Di seguito è riportato un esempio di schema di dispensazione:

Micropiastra Di seguito è riportato un esempio di schema di dispensazione:

Micropiastra

	1	2	3
A	BLK	S2	
B	NC	S3	
C	NC	S4	
D	NC	S5	
E	CAL	S6	
F	CAL	S7	
G	PC	S8	

Legenda:

- BLK = Bianco
- NC = Controllo negativo
- CAL = Calibratore
- PC = Controllo Positivo
- S = Campione

Parametri	Requisiti
Pozzetto bianco	Valore < 0.100 OD450nm
Controllo negativo (NC)	Valore medio < 0,050 OD450nm
Calibratore 0.5 IU/ml	S/CO > 2
Controllo positivo	Valore > 1.000 OD450nm

L. CONTROLLO DI INTERNO

QUALITÀ

Ogni volta che si utilizza il kit viene effettuato un controllo sui controlli e sul calibratore per verificare se i loro valori di OD450nm sono quelli attesi e riportati nella tabella sottostante.

Qualora si verificassero questi problemi, dopo aver verificato, segnalare eventuali problemi residui al supervisore per ulteriori azioni.

Problema	Controllo
Pozzetto bianco > 0.100 OD450nm	che la soluzione di cromogeno / substrato non sia stata contaminata durante il test.
Controllo negativo (NC) > 0.050 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> 1. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalificazione; 2. che sia stata utilizzata la soluzione di lavaggio adeguata e che il lavatore sia stato pretrattato con essa prima dell'uso; 3. che non è stato commesso alcun errore nella procedura del test (dispensazione del controllo positivo invece di quello negativo); 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione del controllo negativo o dei pozzetti in cui è stato dispensato il controllo a causa di fuoriuscite di campioni positivi o del coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non sono state contaminate con campioni positivi o con il coniugato enzimatico; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
Calibratore S/CO < 2	<ol style="list-style-type: none"> 1. che la procedura sia stata eseguita correttamente; 2. che non si sia verificato alcun errore durante la sua distribuzione (es.: dispensazione del controllo negativo al posto del calibratore); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalificazione; 4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna del calibratore.

Controllo positivo < 1.000 OD450nm	1. che la procedura sia stata eseguita correttamente;
	2. che non si sia verificato alcun errore durante la distribuzione del controllo (dispensazione del controllo negativo invece che del controllo positivo. In questo caso, il controllo negativo avrà un valore OD450nm > 0,50);
	3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano convalidate nello studio di prequalificazione;
	4. che non si sia verificata alcuna contaminazione esterna del controllo positivo.

M. CALCOLO DEL CUT-OFF

I risultati dei test sono calcolati mediante un valore di cut-off determinato con la seguente formula sul valore medio OD450nm / 620 - 630nm del Controllo Negativo (NC):

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

Il valore trovato per il test viene utilizzato per l'interpretazione dei risultati come descritto nel paragrafo successivo.

Nota importante: quando il calcolo dei risultati viene eseguito dal sistema operativo di una stazione di lavoro automatizzata ELISA assicurarsi che venga utilizzata la formulazione corretta per calcolare il valore di cut-off e generare le corrette interpretazioni dei risultati.

N. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del test sono interpretati come rapporto tra l'OD450nm del campione e il valore di cut-off (o S/CO) secondo la seguente tabella:

S/CO	Interpretazione
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equivoco
> 1.1	Positivo

Un risultato negativo indica che il paziente non è stato infettato da HBV e che l'unità di sangue può essere trasfusa.

Ogni paziente che mostra un risultato ambiguo deve essere nuovamente testato su un secondo campione prelevato a distanza di 1-2 settimane. L'unità di sangue non deve essere trasfusa.

Un risultato positivo è indicativo di infezione da HBV e pertanto il paziente deve essere trattato di conseguenza o l'unità di sangue deve essere scartata.

Note importanti:

1. L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio e interpretazioni errate.
2. L'eventuale risultato positivo deve essere confermato prima ripetendo la prova sul campione, dopo averlo filtrato su filtro da 0,2 - 0,8 micron per eliminare ogni interferenza da microparticelle. Quindi, se ancora positivo, il campione deve essere sottoposto a un test di conferma prima che venga rilasciata una diagnosi di epatite virale.
3. Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un altro reparto, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.
4. La diagnosi di infezione da epatite virale deve essere valutata e confermata al paziente da un medico adeguatamente qualificato.

Di seguito è riportato un esempio di calcolo:

I dati della seguente tabella devono essere considerati solo come un esempio:

CONTROLLO NEGATIVO	OD 450 nm 0,012 – 0,008 – 0,010
Valore medio OD 450 nm: 0,010	Inferiore a 0,050
ACCETTATO	
CONTROLLO POSITIVO	OD 450 nm 2,489
OD 450 nm superiore a 1,000	
ACCETTATO	
CUT-OFF	0,050 + 0,010 = 0,060
CALIBRATORE	OD 450 nm 0,350 – 0,370
Valore medio OD 450 nm: 0,360	S/CO = 6 maggiore di 2,0
ACCETTATO	
Campione 1 OD 450 nm: 0,028	S/CO < 0,9
NEGATIVO	
Campione 2 OD 450 nm: 1,690	S/CO > 1,1
POSITIVO	

O. PRESTAZIONI

La Valutazione delle Prestazioni è stata condotta in accordo a quanto riportato nelle Specifiche Tecniche Comuni o CTS (art. 5, Capitolo 3 della Direttiva IVD 98/79 / CE).

1. Sensibilità analitica

Il limite di rilevamento del test è stato calcolato in base al 3° standard internazionale dell'OMS, codice NIBSC 12/226.

Nella tabella seguente vengono forniti i risultati per tre lotti (C4T6/5 – C5T7/1 – C5T7/6) di Sclavo-EIA HbsAg

WHO IU/ml	Lot # C4T6/5 S/Co	Lot # C5T7/1 S/Co	Lot # C5T7/6 S/Co
Controllo Negativo (NC)	-	-	-
Controllo Positivo (PC)	63.6	66.0	67.9
Calibratore (CAL)	10.2	10.5	11.2
Cut-off (=NC+0.050)	0.052	0.052	0.053
*WHO 0.5 IU/ml	10.0	10.4	11.2
*WHO 0.25 IU/ml	4.7	5.3	5.5
*WHO 0.1 IU/ml	2.0	2.3	2.6
*WHO 0.05 IU/ml	1.3	1.2	1.2
*WHO 0.025 IU/ml	0.6	0.7	0.7
Matrice negativa per HbsAg (FCS)	0.3	0.2	0.4

**WHO International Standard – Third international Standard, for HbsAg (HBV genotipo B4, HbsAg sottotipo ayw1/adw2). Codice NISBC 12/226 fornito da National Institut for Biological Standards and Controls*

Il test mostra una sensibilità analitica ≤ 0.05 IU / ml di HBsAg

Inoltre, sono stati testati due pannelli di sensibilità forniti da EFS, Francia, e da SFTS, Francia, che hanno fornito, nelle migliori condizioni, i seguenti risultati:

Pannello EFS Ag HBs HB1-HB6 lotto n°04

ID del campione	Caratteristiche	ng/ml	S/CO
HB1	diluent	/	0,2
HB2	adw2+ayw3	0.05	0,6
HB3	adw2+ayw3	0.1	1,0
HB4	adw2+ayw3	0.2	1,7
HB5	adw2+ayw3	0.3	2,6
HB6	adw2+ayw3	0.5	4,2

Pannello di sensibilità SFTS, Francia, Ag HBs 2005

ID del campione	Caratteristiche	ng/ml	S/CO
231	Adw2 + ayw3	2.06	15,4
232	Adw2 + ayw3	1.13	8,3
233	Adw2 + ayw3	1.05	7,4
234	Adw2 + ayw3	0.69	5,2
235	Adw2 + ayw3	0.55	3,9
236	Adw2 + ayw3	0.40	2,9
237	Adw2 + ayw3	0.32	2,1
238	Adw2 + ayw3	0.16	1
239	Adw2 + ayw3	0.08	0,6
240	Adw2 + ayw3	0.04	0,5
241	Adw2	0.5-1.0	4,7
242	Adw4	0.5-1.0	4,1
243	Adr	0.5-1.0	4,5
244	Ayw1	0.5-1.0	4,7
245	Ayw2	0.5-1.0	5,9
246	Ayw3	0.5-1.0	6,4
247	Ayw3	0.5-1.0	5,6
248	Ayw4	0.5-1.0	7,4
249	Ayr	0.5-1.0	6,2
250	diluyente	/	0,3

Anche il pannello # 808, fornito da Boston Biomedical Inc., USA, è stato testato per definire il limite di sensibilità. I risultati nelle migliori condizioni sono i seguenti:

Pannello BBI PHA 808

D del campione	Caratteristiche	ng/ml	S/CO
01	ad	2,49	10,2
02	ad	1,17	4,8
03	ad	1,02	4,3
04	ad	0,96	3,8
05	ad	0,69	2,9
06	ad	0,50	2,2
07	ad	0,41	1,5
08	ad	0,37	1,3
09	ad	0,30	1,2
10	ad	0,23	1,0
11	ay	2,51	11,2
12	ay	1,26	5,9
13	ay	0,97	4,1
14	ay	0,77	3,7
15	ay	0,63	2,0
16	ay	0,48	2,4
17	ay	0,42	2,0
18	ay	0,33	1,8
19	ay	0,23	1,6
20	ay	0,13	1,1
21	negativo	/	0,6

2. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è stata testata secondo quanto richiesto dalle Specifiche Tecniche Comuni (CTS) della direttiva 98/79 / CE sugli IVD per test HBsAg.

Campioni positivi, inclusi i sottotipi HBsAg e un pannello di mutanti "s" dalle mutazioni più frequenti, sono stati raccolti da diverse patologie HBV (epatite B acuta, asintomatica e cronica) o prodotti sinteticamente e sono stati rilevati positivi nel test.

Tutti i sottotipi noti di HBsAg, "ay" e "ad", e le isoforme "w" e "r", forniti da CNTS, Francia, sono stati testati e sono stati determinati positivi dal kit come previsto.

Un valore complessivo del 100% è stato riscontrato in uno studio condotto su un numero totale di oltre 400 campioni positivi testati con un kit marcato CE.

Sono stati studiati un totale di 30 siero-conversioni, la maggior parte delle quali prodotte da Boston Biomedica Inc., USA. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti esaminando otto pannelli forniti da Boston Biomedica Inc., USA, per Sclavo-EIA HBsAg rispetto al dispositivo di riferimento.

ID del pannello	1° campione positivo	HBsAg sottotipo	HBsAg ng/ml	VersionULTRA S/CO	Ref. deviceS/CO
PHM 906	02	ad	0.5	3.7	1.4
PHM 907 (M)	06	ay	1.0	4.4	2.9
PHM 909	04	ad	0.3	1.2	0.8
PHM 914	04	ad	0.5	1.1	1.1
PHM 918	02	ad	0.1	1.8	0.5
PHM 923	03	ay	<0.2	2.2	1.2
PHM 925	03	Ind.	n.d.	1.4	0.9
PHM 934	01	ad	n.d.	1.0	0.8

3. Specificità diagnostica

È definita come la probabilità del test di ottenere un risultato negativo in assenza di analita specifico. Oltre al primo studio, dove sono stati esaminati 5043 campioni negativi da donatori di sangue (due centri del sangue), classificati negativi con dispositivo marcato CE in uso presso il laboratorio di raccolta, è stata recentemente valutata la specificità diagnostica aggiungendo 2288 campioni per un totale di 7331 donatori di sangue negativi su sette diversi lotti. È stato trovato un valore di specificità del **99.8%**. I risultati discrepanti (n=10) si sono rivelati Falsi Positivi e provenivano tutti da pazienti con una via alterata della coagulazione: i campioni presentavano coaguli e particelle di fibrina. Dopo filtrazione sono risultati negativi (sezione G.4).

Sia i plasmi, derivati con diverse tecniche standard di preparazione (citrato, EDTA ed eparina), sia i sieri sono stati utilizzati per determinare la specificità.

Non è stata osservata alcuna falsa reattività dovuta al metodo di preparazione del campione.

Sono stati inoltre testati campioni congelati per verificare se il congelamento dei campioni interferisce con le prestazioni del test. Nessuna interferenza è stata osservata su campioni puliti e privi di particelle.

Sono stati esaminati campioni derivati da pazienti con diverse patologie virali (HCV, HAV) e non virali del fegato che possono interferire con il test. Non sono state osservate reazioni crociate.

Anche i campioni congelati sono stati testati per verificare la presenza di interferenze dovute alla raccolta e alla conservazione. Non è stata osservata alcuna interferenza.

4. Precisione

È stato calcolato per Sclavo-EIA HBsAg su due campioni esaminati in 16 repliche in 3 diverse analisi per tre lotti. I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Valori medi totale n = 144	Campioni negativi	Calibratore 0.5 IU/ml
OD450nm	0.026	0.332
Deviazione standard	0.004	0.027
CV %	16%	8%

La variabilità mostrata nelle tabelle non ha comportato un'errata classificazione del campione.

P. LIMITAZIONI

Risultati falsi positivi ripetibili sono stati valutati su campioni appena raccolti in meno dello 0,1% della popolazione normale, principalmente a causa di anticorpi eterofili anti-topo (HAMA) ad alto titolo. Sono state osservate interferenze in campioni freschi anche quando non erano privi di particelle o erano stati raccolti male (vedi capitolo G). Campioni vecchi o congelati, che presentano coaguli di fibrina, crioglobuline, micelle o microparticelle contenenti lipidi dopo la conservazione o lo scongelamento, possono generare risultati falsi positivi.

Q. BIBLIOGRAFIA

1. **Aach R.D., Grisham J.W., Parker S.W.** Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc.Natl.Acad.Sci..USA, 68:1956, 1971.
2. **Blumerg B.S., Suinick A.I., London W.T.** Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. Bull.N.Y.Acad.Med.. 44:1566, 1968.
3. **Boniolo A., Dovis M., Matteja R.** The use of enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies against hepatitis B surface antigen. J. Immunol.Meth.. 49:1, 1982.
4. **Caldwell C.W., Barpet J.T.** Test immunoenzimatico per l'epatite B e confronto con altri metodi. Cli.Chim.Acta 81: 305, 1977
5. **Fazekas S., De St.Groth, Scheidegger D.** Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Meth.. 35: 1, 1980
6. **Reesink H.W. et al.** Comparison of six 3rd generation tests for the detection of HBsAg. Vox.Sang.. 39:61, 1980.
7. **Rook G.A.W.** Chromogens for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using horseradish peroxidase.

Lepr.Rev. 52: 281, 1981.

8. **Schroder J.** Monoclonal antibodies: a new tool for reasearch and immunodiagnostic. Med.Biol.. 58: 281, 1981
9. **Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK.** Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. J.Med.Virol. 1999;59(1):19-24.
10. **Lee JM, Ahn SH.** Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. World J Gastroenterol. 2011 Jan 21;17(3):283-9. doi:10.3748/wjg.v17.i3.283. PMID: 21253386; PMCID: PMC3022287.
11. **Kuhns MC, Holzmayer V, McNamara AL, Sickinger E, Schultess J, Cloherty GA.** Improved detection of early acute, late acute, and occult Hepatitis B infections by an increased sensitivity HBsAg assay. J Clin Virol. 2019 Sep; 118:41-45. doi: 10.1016/j.jcv.2019.08.001. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31442662.
12. **Thibault V, Servant-Delmas A, Ly TD, Roque-Afonso AM, Laperche S.** Performance of HBsAg quantification assays for detection of Hepatitis B virus genotypes and diagnostic escape-variants in clinical samples. J Clin Virol. 2017 Apr; 89:14-21. doi: 10.1016/j.jcv.2017.02.001. Epub 2017 Feb 4. PMID: 28189936.
13. **Li Y, Cai Q, Xie Q, Zhang Y, Meng X, Zhang Z.** Different Mechanisms May Exist for HBsAg Synthesis and Secretion During Various Phases of Chronic Hepatitis B Virus Infection. Med Sci Monit. 2017 Mar 21; 23:1385-1393. doi: 10.12659/msm.902889. PMID: 28321112; PMCID: MC5370389

Simboli utilizzati

 = Dispositivo medico diagnostico in vitro

 = Numero di catalogo

 = Numero del lotto



= Fabbricante



= Data di scadenza



= Temperatura di conservazione



= Istruzioni d'uso