



---

# EIAgen

## HBsAg Kit

---

**REF** 071011

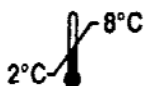
$\Sigma$  96

**REF** 071012

$\Sigma$  192

**REF** 071015

$\Sigma$  480



**IVD**



This package insert must be read carefully before product use.

Package insert instructions must be carefully followed.

Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package.



**Manufacturer:**

**Adaltis S.r.l**

Via Durini, 27





















20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

[www.adaltis.net](http://www.adaltis.net)

**en**

**SYMBOLS USED ON LABELS**

<b>English</b> <b>EN</b>							
	In Vitro Diagnostic Medical Device	Catalogue Number	Lot Number	Attention, See Instructions For Use	Temperature Limitation	Use By	Number of Test
							
	Manufacturer	Keep away from Sunlight	Date of Manufacture	Biological Risk	Microplate	Positive Control	Negative Control
							
	Conjugate	Assay Diluent	Substrate A (Urea Peroxide)	Substrate B (TMB)	Stop Solution (0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Wash Buffer Conc. (20x)	

**A. INTENDED USE**

EIAgen HBsAg Kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative detection of HBsAg in human serum or plasma (EDTA, sodium citrate or heparin). It is intended for screening of blood donors and for diagnosing of patients related to infection with hepatitis B virus.

For "in vitro" diagnostic use only.

**B. INTRODUCTION**

Hepatitis B virus (HBV) is an enveloped, double-stranded DNA virus belonging to the Hepadnaviridae family and is recognized as the major cause of blood transmitted hepatitis together with hepatitis C virus (HCV). Infection with HBV induces a spectrum of clinical manifestations ranging from mild, inapparent disease to fulminant hepatitis, severe chronic liver diseases, which in some cases can lead to cirrhosis and carcinoma of the liver. Classification of a hepatitis B infection requires the identification of several serological markers expressed during three phases (incubation, acute and convalescent) of the infection. Now several diagnostic test are used for screening, clinical diagnosis and management of the disease. Hepatitis B surface antigen or HBsAg, previously described as Australia antigen, is the most important protein of the envelope of Hepatitis B Virus. The surface antigen contains the determinant "a", common to all known viral subtypes and immunologically distinguished in two distinct subgroups (ay and ad). HBV has 10 major serotypes and four HBsAg subtypes have been recognized (adw, ady, ayw, and ayr). HBsAg can be detected 2 to 4 weeks before the ALT levels become abnormal and 3 to 5 weeks before symptoms develop. The serological detection of HBsAg is a powerful method for the diagnosis and prevention of HBV infection and ELISA has become an extensively used analytical system for screening of blood donors and clinical diagnosis of HBV in infected individuals.

**C. PRINCIPLE OF THE TEST**

For detection of HBsAg, EIAgen HBsAg Kit uses antibody "sandwich" ELISA method in which, polystyrene microwell strips are pre-coated with monoclonal antibodies specific to HBsAg. Patient's serum or plasma sample is added to the microwells. During incubation, the specific immunocomplex formed in case of presence of HBsAg in the sample, is captured on the solid phase. Then the second antibody conjugated the enzyme horseradish peroxidase (the HRP-Conjugate) directed against a different epitope of HBsAg is added into the wells. During the second incubation step, these HRP-conjugated antibodies will be bound to any anti-HBs-HBsAg complexes previously formed during the first incubation, and the unbound HRP-conjugate is then removed by washing. Chromogen solutions containing tetramethyl-benzidine (TMB) and urea peroxide are added to the wells. In presence of the antibody-antigen-antibody(HRP) "sandwich" immunocomplex, the colorless Chromogens are hydrolyzed by the bound HRP-conjugate to a blue-colored product. The blue color turns yellow after stopping the reaction with sulfuric acid. The amount of color intensity can be measured and it is proportional to the amount of antigen captured in the

wells, and to its amount in the sample respectively. Wells containing samples negative for HBsAg remain colorless.

**D. COMPONENTS**

The kit contains reagents for 96 tests (code 071011), 192 tests (code 071012), or 480 tests (code 071015).

<b>Microplate</b>	1
<b>Negative Control</b>	1 x 1.5 mL/vial
<b>Positive Control</b>	1 x 1.5 mL/vial
<b>Conjugate</b>	1 x 6 mL/vial
<b>Assay Diluent</b>	1 x 5 mL/vial
<b>Substrate Solution A (Urea Peroxide)</b>	1 x 6 mL/vial
<b>Substrate Solution B (TMB)</b>	1 x 6 mL/vial
<b>Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.5M)</b>	1 x 6 mL/vial
<b>Wash Buffer Concentrate 20X</b>	1 x 30 mL/vial
<b>Plate Sealing Foils</b>	2
<b>Plastic Sealable Bag</b>	1
<b>Number of tests</b>	96
<b>Code</b>	071011

<b>Microplate</b>	2
<b>Negative Control</b>	1 x 1.5 mL/vial
<b>Positive Control</b>	1 x 1.5 mL/vial
<b>Conjugate</b>	2 x 6 mL/vial
<b>Assay Diluent</b>	2 x 5 mL/vial
<b>Substrate Solution A (Urea Peroxide)</b>	2 x 6 mL/vial
<b>Substrate Solution B (TMB)</b>	2 x 6 mL/vial
<b>Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.5M)</b>	2 x 6 mL/vial
<b>Wash Buffer Concentrate 20X</b>	2 x 30 mL/vial
<b>Plate Sealing Foils</b>	3
<b>Plastic Sealable Bag</b>	2
<b>Number of tests</b>	192
<b>Code</b>	071012

<b>Microplate</b>	5
<b>Negative Control</b>	4 x 1.5 mL/vial
<b>Positive Control</b>	4 x 1.5 mL/vial
<b>Conjugate</b>	5 x 6 mL/vial
<b>Assay Diluent</b>	4 x 5 mL/vial
<b>Substrate Solution A (Urea Peroxide)</b>	5 x 6 mL/vial
<b>Substrate Solution B (TMB)</b>	5 x 6 mL/vial
<b>Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.5M)</b>	1 x 30 mL/vial
<b>Wash Buffer Concentrate 20X</b>	3 x 50 mL/vial
<b>Plate Sealing Foils</b>	6
<b>Plastic Sealable Bag</b>	5
<b>Number of tests</b>	480
<b>Code</b>	071015

**1. Microplate**

Blank microwell strips fixed on white strip holder.

12 strips of 8 microwells coated with monoclonal antibodies reactive to HBsAg (anti-HBs).

Plates are sealed into a aluminium pouch with desiccant. The microwell strips can be broken to be used separately. Place unused wells or strips in the provided plastic sealable storage bag together with the desiccant and return to 2...8°C. Once open, stable for one month at 2...8°C.

**2. Negative Control**

Yellowish liquid filled in a vial with natural screw cap.

Protein-stabilized buffer tested non-reactive for HBsAg.

Ready to use as supplied. It contains preservative.

Once open, stable for one month at 2...8°C.

### 3. Positive Control

Red-colored liquid filled in a vial with red screw cap.  
HBsAg diluted in protein-stabilized buffer.  
Ready to use as supplied. It contains preservative.  
Once open, stable for one month at 2...8°C.

**Important Note:** *The absence of viable pathogens in the Positive Control can not be fully ensured, and therefore, the reagent should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.*

### 4. Conjugate

Red-colored liquid in a white vial with green screw cap.  
Horseradish peroxidase-conjugated anti-HBs antibodies.  
Ready to use as supplied. It contains preservative.  
Once open, stable for one month at 2...8°C.

### 5. Assay Diluent

Green-colored in a vial with pink screw cap.  
Serum base, casein, and sucrose solution.  
Ready to use as supplied. It contains preservative.  
Once open, stable for one month at 2...8°C.

### 6. Substrate Solution "A"

Colorless liquid filled in a white vial with grey screw cap.  
Urea peroxide solution.  
Ready to use as supplied.  
Once open, stable for one month at 2...8°C.

### 7. Substrate Solution "B"

Colorless liquid filled in a black vial with black screw cap.  
TMB (Tetramethyl benzidine solution).  
Ready to use as supplied.  
Once open, stable for one month at 2...8°C.

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

### 8. Stop Solution

Colorless liquid in a white vial with red screw cap.  
Diluted sulfuric acid solution (0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).  
Ready to use as supplied.  
Once open, stable for one month at 2...8°C.

**The MSDS is available upon request of laboratory personnel.**

### 9. Wash Buffer Concentrate 20x

Colorless liquid filled in a clear bottle with natural screw cap. pH 7.4, 20 × PBS  
The concentrate must be diluted **1 to 20** with distilled/deionized water before use.  
Once diluted, stable for one week at room temperature, or for two weeks when stored at 2...8°C.

## E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (20, 50, 100 µL) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of 37 ± 0.5°C.

6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and possibly with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

## F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.  
This package insert must be read carefully before product use.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Substrate Solution "B" (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
6. Upon receipt, store the kit at 2...8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984. Materials from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control of the kit. These materials have been tested with tests kits with accepted

performance and found negative for antibodies to HIV 1/2, HCV, TP and HBsAg. However, there is no analytical method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Bovine derived sera have been used for stabilizing of the positive and negative controls. Bovine serum albumin (BSA) and fetal calf sera (FCS) are derived from animals from BSE/TSE free-geographical areas.

13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min.
15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
16. The Stop Solution contains 0.5M sulphuric acid. Avoid contact with skin and eyes. In the event of contact, rinse immediately with plenty of water.
17. ProClin™ 300 0.1% used as preservative, can cause sensation of the skin. Wipe up spills immediately or wash with water if come into contact with the skin or eyes.
18. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas in which specimens or kit reagents are handled
19. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.
20. Do not pipette by mouth.

## G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

### 1. Specimen Collection:

No special patient's preparation required. Collect the specimen in accordance with the normal laboratory practice. Either fresh serum or plasma specimens can be used with this assay. Blood collected by venipuncture should be allowed to clot naturally and completely - the serum/plasma must be separated from the clot as early as possible as to avoid haemolysis of the RBC. Care should be taken to ensure that the serum specimens are clear and not contaminated by microorganisms. Any visible particular matters in the specimen should be removed by centrifugation at 3000 RPM (round per minutes) for 20 minutes at room temperature or by filtration.

2. Plasma specimens collected into EDTA, sodium

citrate or heparin may be tested, but **highly lipaemic, icteric, or hemolytic specimens should not be used** as they can give false results in the assay. **Do not heat inactivate specimens.** This can cause deterioration of the target analyte. Samples with visible microbial contamination should never be used.

3. EIAgen HBsAg Kit is intended ONLY for testing of individual serum or plasma samples. Do not use the assay for testing of cadaver samples, saliva, urine or other body fluids, or pooled (mixed) blood.
4. **Transportation and Storage:** Store specimens at 2...8°C. Specimens not required for assaying within 7 days should be stored frozen (-20°C or lower). Multiple freeze-thaw cycles should be avoided. For shipment, samples should be packaged and labeled in accordance with the existing local and international regulations for transportation of clinical samples and ethological agents.

## H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

The components of the kit will remain stable through the expiration date indicated on the label and package when stored between 2...8°C, do not freeze. To assure maximum performance of EIAgen HBsAg Kit, during storage, protect the reagents from contamination with microorganism or chemicals.

### 1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (18...30°C), about 1 hr, before opening the pouch. Unused strips have to be placed inside the plastic sealable bag, with the desiccant supplied and stored at 2...8°C. After first opening, remaining strips are stable one month at 2...8°C.

### 2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

### 3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Handle this component as potentially infectious.

### 4. Conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

### 5. Assay Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

### 6. Substrate Solution "A" and "B":

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces. If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

### 7. Stop Solution:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

#### 8. Wash Buffer Concentrate 20x (vial of 30 mL):

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with distilled/deionized water up to 600 mL (up to 1000 mL for the vial of 50 mL), the volume is reported on the label, and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

**Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at room temperature and two weeks at 2...8°C.**

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

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of  $\pm 2\%$ . Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at  $+37^{\circ}\text{C}$  (tolerance of  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.

#### 3. INSTRUCTIONS FOR WASHING

The ELISA washer is extremely important to the overall performances of the assay:

- A good washing procedure is essential in order to obtain correct and precise analytical data.
- It is therefore, recommended to use a good quality ELISA microplate washer, maintained at the best level of washing performances. In general, no less than **5** automatic washing cycles of 350-400  $\mu\text{L}$ /well are sufficient to avoid false positive reactions and high background.
- To avoid cross-contaminations of the plate with specimen or HRP-conjugate, after incubation, do not discard the content of the wells but allow the plate washer to aspirate it automatically.
- Assure that the microplate washer liquid dispensing channels are not blocked or contaminated and sufficient volume of Wash buffer is dispensed each time into the wells.
- In case of manual washing, we suggest to carry out **5 washing cycles**, dispensing 350-400  $\mu\text{L}$ /well and aspirating the liquid for **5** times. If poor results (high background) are observed, increase the washing cycles or soaking time per well.
- In any case, the liquid aspirated out the strips should be treated with a sodium hypochlorite solution at a final concentration of 2.5% for 24 hours, before they are wasted in an appropriate way.
- The concentrated Wash buffer should be diluted **1:20** before use. If less than a whole plate is used, prepare the proportional volume of solution.

4. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and ideally with a second filter (630nm) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth  $\leq 10$  nm; (b) absorbance range from 0 to  $\geq 2.0$ ; (c) linearity to  $\geq 2.0$ ; repeatability  $\geq 1\%$ . Blanking is carried out on the well identified in section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
5. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in section O "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The tapping out of the remainders inside the plate after washing, can also be omitted.

### L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Substrate Solutions "A" and "B" are colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Buffer as described above.
4. Allow all the other components to reach room temperature ( $18...30^{\circ}\text{C}$ ), about 1 hr and then mix as described.
5. Set the ELISA incubator at  $+37^{\circ}\text{C}$  and prepare the ELISA washer by priming with the diluted wash solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as found in section I.3.
6. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
7. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
8. Check that the micropipettes are set to the required volume.

9. Check that all the other equipment is available and ready to use.
10. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

### M. ASSAY PROCEDURE

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

#### MANUAL ASSAY:

1. **Preparation:** Mark three wells as Negative control (e.g. B1, C1, D1), two wells as Positive control (e.g. E1, F1) and one Blank (e.g. A1, neither samples nor Conjugate should be added into the Blank well). If the results will be determined by using dual wavelength plate reader, the requirement for use of Blank well could be omitted. Use only number of strips required for the test.
2. **Adding Diluent:** Add 20µL of Assay Diluent into each well except the Blank.
3. **Adding Sample:** Add 100µL of Positive control, Negative control, and Specimen into their respective wells except the Blank. **Note: Use a separate disposal pipette tip for each specimen, Negative Control, Positive Control to avoid cross-contamination. Mix by tapping the plate gently.**
4. **Incubating:** Cover the plate with the plate cover and incubate for **60 minutes at 37°C**.
5. **Adding Conjugate:** At the end of the incubation, remove and discard the plate cover. Add 50µL Conjugate into each well except the Blank, and mix by tapping the plate gently.
6. **Incubating:** Cover the plate with the plate cover and incubate for **30 minutes at 37°C**.
7. **Washing:** At the end of the incubation, remove and discard the plate cover. Wash each well **5 times** with diluted Washing buffer. Each time allow the microwells to soak for **30-60 seconds**. After the final washing cycle, turn down the plate onto blotting paper or clean towel and tap it to remove any remainders (see section I.3).
8. **Coloring:** Add 50µL of Substrate Solution "A" and 50µL Substrate Solution "B" into each well including the Blank. Incubate the plate at **37°C for 30 minutes avoiding light**. The enzymatic reaction between the Substrate Solutions and the Conjugate produces blue color in Positive control and HBsAg positive sample wells.
9. **Stopping Reaction:** Using a multichannel pipette or manually, add 50µL Stop solution into each well and mix gently. Intensive yellow color develops in Positive control and HBsAg positive sample wells.
10. **Measuring the Absorbance:** Calibrate the plate reader with the Blank well and read the absorbance at **450nm**. If a dual filter instrument is used, set the reference wavelength at **630nm**. Calculate the Cut-off value and evaluate the results. (**Note:** read the absorbance within **10 minutes** after stopping the reaction).

#### Important notes:

1. If the second filter is not available, ensure that no finger prints are present on the bottom of the

microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.

2. Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 10 minutes afterwards. Some self oxidation of the substrate can occur leading to a higher background.

### N. ASSAY SCHEME

Steps	Operations
Assay Diluent	20 µL
Controls and Samples	100 µL
<b>1<sup>st</sup> incubation</b>	<b>60 min</b>
Temperature	+37°C
Conjugate	50 µL
<b>2<sup>nd</sup> incubation</b>	<b>30 min</b>
Temperature	+37°C
Wash Step	5 cycles (see section I.3)
Substrate "A"	50 µL
Substrate "B"	50 µL
<b>3<sup>rd</sup> incubation</b>	<b>30 min (avoiding light)</b>
Temperature	+37°C
Stop Solution	50 µL
Reading OD	450/630nm

An example of dispensation scheme is reported below (valid for both incubation time procedures):

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3											
B	NC	S4											
C	NC	S5											
D	NC	S6											
E	PC	S7											
F	PC	S8											
G	S1	S9											
H	S2	S10											

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

### O. INTERNAL QUALITY CONTROL

The test results are valid if the Quality Control criteria are fulfilled. It is recommended that each laboratory must establish appropriate quality control system with quality control material similar to or identical with the patient sample being analyzed.

- The A value of the Blank well, which contains only Chromogen and Stop Solution, is < 0.080 at 450 nm.
- The A values of the Positive Control must be ≥ 0.800 at 450/630nm or at 450nm after blanking.
- The A values of the Negative Control must be < 0.100 at 450/630nm or at 450nm after blanking.

If one of the Negative control A values does not meet the Quality Control criteria, it should be discarded and the mean value calculated again using the remaining two values. If more than one Negative control A values do not meet the Quality Control Range specifications, the test is invalid and must be repeated.

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section. If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problems	Check
<b>Blank well</b> ≥ 0.080 OD at 450nm	1. that the Substrate Solutions have not become contaminated during the assay
<b>Negative Control (NC)</b> ≥ 0.100 OD at 450/630nm or at 450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to spills of positive samples or of the conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
<b>Positive Control</b> < 0.800 OD at 450/630nm or at 450nm after blanking	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

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

### P. RESULTS

Each microplate should be considered separately when calculating and interpreting the results of the assay, regardless of the number of plates concurrently processed. The results are calculated by relating each specimen absorbance (A) value to the Cut-off value (C.O.) of the plate. If the Cut-off reading is based on single filter plate reader, the results should be calculated by subtracting the Blank well A value from the print report values of specimens and controls. In case the reading is based on dual filter plate reader, do not subtract the Blank well A value from the print report values of specimens and controls.

$$\text{Cut-Off (C.O.)} = \text{NC mean} + 0.06$$

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

An example of calculation is reported below:

### Example:

#### 1. Quality Control

Blank well A value: A1= 0.025 at 450nm (Note: blanking is required only when reading with single filter at 450nm)

**Well No.:** B1 C1 D1  
 Negative control A values after blanking: 0.020 0.012 0.016

**Well No.:** E1 F1  
 Positive control A values after blanking: 2.421 2.369  
 All control values are within the stated quality control range

$$2. \text{ Calculation of Nc: } = \frac{(0.020+0.012+0.016)}{3} = 0.016$$

$$3. \text{ Calculation of the Cut-off: (C.O.)} = 0.016 + 0.06 = 0.076$$

### Q. INTERPRETATION OF RESULTS

#### Negative Results (A / C.O. < 0.9):

Specimens giving absorbance less than the Cut-off value are negative for this assay, which indicates that no hepatitis B virus surface antigen has been detected with EIAGEN HBsAg Kit, therefore the patient is probably not infected with HBV and the blood unit do not contain hepatitis B virus surface antigen and could be transfused in case that other infectious diseases markers are also absent.

#### Positive Results (A / C.O. > 1.1):

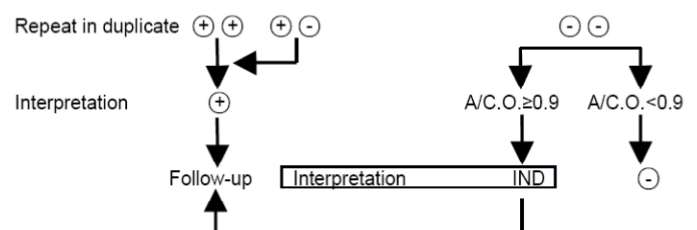
Specimens giving an absorbance equal to or greater than the Cut-off value are considered initially reactive, which indicates that hepatitis B virus surface antigen has probably been detected using EIAGEN HBsAg Kit. All initially reactive specimens should be retested in duplicates using EIAGEN HBsAg Kit before the final assay results interpretation. Repeatedly reactive specimens can be considered positive for hepatitis B virus surface antigen with EIAGEN HBsAg Kit.

#### Borderline (A / C.O. = 0.9-1.1):

Specimens with absorbance to Cut-off ratio between 0.9 and 1.1 are considered borderline and retesting of these specimens in duplicates is required to confirm the initial results.

**Follow-up, confirmation and supplementary testing of any positive specimen with other analytical system (e.g. PCR) is required. Clinical diagnosis should not be established based on a single test result. It should integrate clinical and other laboratory data and findings.**

#### INITIAL RESULTS INTERPRETATION AND FOLLOW-UP ALL INITIALLY REACTIVE OR BORDERLINE SAMPLES



IND = non interpretable



If, after retesting of the initially reactive samples, both wells are negative results (A/C.O.<0.9), these samples should be considered as non-repeatable positive (or false positive) and recorded as negative. As with many very sensitive ELISA assays, false positive results can occur due to the several reasons, most of which are connected with, but not limited to, inadequate washing step. For more information regarding "Troubleshooting Guide" (section S).

If after retesting in duplicates, one or both wells are positive results, the final result from this ELISA test should be recorded as repeatedly reactive. Repeatedly reactive specimens could be considered positive for hepatitis B virus surface antigen and therefore the patient is probably infected with HBV and the blood unit must be discarded.

After retesting in duplicates, samples with values close to the Cut-off value should be interpreted with caution and considered as "borderline" zone sample, or uninterpretable for the time of testing.

**Important notes:**

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another department, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

**R. PERFORMANCES**

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC).

Evaluation studies carried out in Paul-Ehrlich-Institut (PEI), German Red Cross Institute Baden-Württemberg – Hessen, and three blood banks, demonstrated the following performance characteristics of EIAGEN HBsAg Kit.

**1. SPECIFICITY**

When evaluated on European blood donors (n=5038), the overall diagnostic specificity of the kit was 99.78%.

During multi-center evaluation (Site A, B and C), EIAGEN HBsAg Kit demonstrated specificity of 99.92%.

Laboratory	Number	EIAGEN HBsAg Kit		
		-	+	Specificity
"A" blood bank	1958	1955	3	99.85%
"B" blood bank	2518	2516	2	99.92%
"C" blood bank	6344	6340	4	99.94%
Total	10820	10811	9	99.92%

**2. SENSITIVITY**

EIAGEN HBsAg Kit was evaluated for sensitivity on 22 HBV commercial available HBV seroconversion panels, and on total 403 HBsAg positive including 146 HBsAg HBV genotyped and HBsAg subtyped plasma samples available at the Paul-Ehrlich-Institut. With respect to seroconversion sensitivity, the results for EIAGEN HBsAg Kit on the 22 HBV seroconversion panels showed a sensitivity level at least equivalent with the range of current CE marked HBsAg screening assays for which PEI holds data. 10 additional seroconversion panels were tested in-house. The seroconversion sensitivity was comparable to other CE-marked HBsAg screening test. With respect to diagnostic sensitivity EIAGEN HBsAg Kit detected all positive samples as positive, including the HBV genotypes A-F or HBsAg subtypes examined.

In conclusion, the overall score of EIAGEN HBsAg Kit for the seroconversion sensitivity was comparable with other CE marked HBsAg test kits for which PEI holds data and all 403 HBsAg positive samples were reactive giving an overall sensitivity of 100%.

**3. ANALYTICAL SENSITIVITY**

0.1 IU/mL (NIBSC 00/588)

**4. ANALYTICAL SPECIFICITY**

No interference was observed with samples from patients with high-level of rheumatoid factor, and pregnant woman. Same day and frozen specimens have been tested to check for interferences due to collection and storage. Total of 100 samples reactive for anti-HBc, anti-HCV and anti-HIV-1 were screened for HBsAg with EIAGEN HBsAg Kit. 98 out of 100 samples were negative for HBsAg. 200 blood samples from patients were also tested with EIAGEN HBsAg Kit. 191 out of 200 samples had negative screening results for HBsAg. 8 out of 9 samples with initial reactive screening results had repeat reactive test results with EIAGEN HBsAg Kit but hepatitis B virus was not confirmed in all cases.

**5. DETECTION OF MUTATIONS**

Panel of 108 samples sequenced by PCR were tested to demonstrate the performance of EIAGEN HBsAg Kit in detection of HBsAg mutations. The results are given in the table below.

Background	Number	EIAGEN HBsAg Kit
adr (+)	wild type	35
	4 mutations	5
adw (+)	wild type	37
	16 mutations	25
ayw (+)	wild type	2
	2 mutations	2
ayr (+)	2 mutations	2
Total	108	101

## 6. REPRODUCIBILITY

Reproducibility		Within Run		Between Run	
Specimen Type	n	Mean OD	CV%	Mean OD	CV%
0.1 IU/mL HBsAg	10	0.155	10.6%	0.150	11.0%
Weak positive	10	0.457	9.0%	0.432	9.5%
Moderate positive	10	1.572	7.0%	1.437	7.5%
Strong positive	10	2.327	4.2%	2.302	4.4%
Positive control	10	2.322	4.1%	2.315	4.2%

## S. SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors:

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different ( $\pm 50\%$ ) from OD reported on QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>-incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation)</li> <li>-error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>-contamination of Substrate Solutions or Conjugate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> </ul>
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> <li>-not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>-error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>-contamination of Substrate Solutions (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> <li>-pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)</li> </ul>
no colorimetric reaction after addition of substrate solutions	<ul style="list-style-type: none"> <li>-some reagent not pipetted</li> <li>- strong contamination of Conjugate or Substrate Solutions</li> <li>-errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)</li> </ul>
too low reaction (too low ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-incubation time too short, incubation temperature too low</li> <li>-incorrect conjugate dilution</li> </ul>
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-incorrect conjugate dilution</li> <li>-incubation time too long, incubation temperature too high</li> <li>-water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)</li> <li>-insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>
unexplainable outliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>-contamination of pipettes, tips or containers</li> <li>-inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>

too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>-reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temperature prior to use</li> <li>- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)</li> </ul>
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>-incubation conditions not constant (time, temperature)</li> <li>-controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)</li> <li>-person-related variation</li> </ul>

## T. AUTOMATION

The procedures identified in this Instruction for Use are for manual testing only. When using automated instruments, follow the procedures that are contained in the operator's manual provided by the device manufacturer. Laboratories must follow their approved validation procedures to demonstrate compatibility of this product on automated systems.

## U. LIMITATIONS

1. Positive results must be confirmed with another available method and interpreted in conjunction with the patient clinical information.
2. Antigens may be undetectable during the early stage of the disease. Therefore, negative results obtained with EIAgen HBsAg Kit are only indication that the sample does not contain detectable level of hepatitis B virus surface antigen and any negative result should not be considered as conclusive evidence that the individual is not infected with HBV or the blood unit is not infected with HBV.
3. If, after retesting of the initially reactive samples, the assay results are negative, these samples should be considered as non-repeatable (false positive) and interpreted as negative. As with many very sensitive ELISA assays, false positive results can occur due to the several reasons, most of which are related but not limited to inadequate washing step. For more information please refer to "Troubleshooting Guide", or contact Adaltis technical support for further assistance.
4. The most common assay mistakes are: using kits beyond the expiry date, bad washing procedures, contaminated reagents, incorrect assay procedure steps, insufficient aspiration during washing, failure to add specimens or reagents, improper operation with the laboratory equipment, timing errors, the use of highly hemolyzed specimens or specimens containing fibrin, incompletely clotted serum specimens.
5. The prevalence of the marker will affect the assay's predictive values.
6. This assay cannot be utilized to test pooled (mixed) plasma. EIAgen HBsAg Kit has been evaluated only with individual serum or plasma specimens.
7. EIAgen HBsAg Kit is a qualitative assay and the results cannot be used to measure antigen concentration.

## 8. INDICATIONS OF INSTABILITY DETERIORATION OF THE REAGENT:

Values of the Positive or Negative controls, which are out of the indicated quality control range, are indicators of possible deterioration of the reagents and/or operator or equipment errors. In such case, the results should be considered as invalid and the

samples must be retested. In case of constant erroneous results and proven deterioration or instability of the reagents, immediately substitute the reagents with new one or contact Adaltis technical support for further assistance.

## **BIBLIOGRAPHY**

1. Stevens, C. E., P. E. Taylor, and M. J. Tong. 1988. Viral hepatitis and liver disease. Alan R. Riss, New York, N.Y. 142. Stevens, C. E., P. E. Taylor, M. J. Tong, P. T. Toy, G. N. Vyas, P. V. Nair.
2. J. Y. Weissman, and S. Krugman. 1987. Yeast-recombinant hepatitis B vaccine. Efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. *JAMA* 257:2612–2616. 143. Stevens, C. E., P. T. Toy, P. E. Taylor, T. Lee, and H. Y. Yip. 1992. Prospects for control of hepatitis B virus infection: implications of childhood vaccination and long term protection. *Pediatrics* 90(Suppl.):170–173.
3. Hurie, M. B., E. E. Mast, and J. P. Davis. 1992. Horizontal transmission of hepatitis B virus infection to U.S. born children of Hmong refugees. *Pediatrics* 89:269–273.
4. Szmuness, W., C. E. Stevens, E. J. Harley, E. A. Zang, W. R. Olesko, D. C. Williams, R. Sadovsky, J. M. Morrison, and A. Kellner. 1980. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled trial in a high risk population in the U.S. *N. Engl. J. Med.* 303:833–841.
5. Bhatnagar, P. K., E. Papas, H. E. Blum, D. R. Milich, D. Nitecki, M. J. Karels, and G. N. Vyas. 1982. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4400–4404.






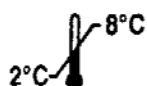
---

# EIAgen

## HBsAg Kit

---

<b>REF</b> 071011	 96
<b>REF</b> 071012	 192
<b>REF</b> 071015	 480



**IVD**



Ezt a használati utasítást figyelmesen el kell olvasni a termék használatát megelőzően.

A csomagolási előírat instrukcióit figyelmesen kell követni.



















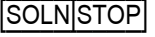

A tesztek megbízhatósága nem garantált, ha ezen csomagolási előíratban foglaltaktól bármilyen eltérés történik.



**Gyártó:**  
**Adaltis S.r.l**  
Via Durini, 27  
20122 Milano (Italy)  
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085  
[www.adaltis.net](http://www.adaltis.net)

**hu**

**CÍMKÉKEN HASZNÁLTOS JELZÉSEK**

<b>Magyar HU</b>							
	In Vitro Diagnosztikum	Katalógusban Szereplő Kód	Lot Szám	Figyelem, olvassa el a felhasználói útmutatót	Hőmérsékleti Korlátozások	Lejárati Idő	Vizsgálatok Száma
							
	Gyártó	Óvja a Napfénytől	Gyártás Időpontja	Biológiai rizikó	Mikrotiterlemez	Pozitív Kontroll	Negatív Kontroll
							
	Konjugátum	Teszt hígító	Szubsztrát A (Urea peroxid)	Szubsztrát B (TMB)	Stop oldat (0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Mosópuffer Koncentrátum 20x	

## A. HASZNÁLATI CÉL

Az EIAGEN HBsAg Kit egy enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA) HBsAg humán szérumban vagy plazmában (EDTA, nátrium citrat vagy heparin) történő kvalitatív kimutatására. Véradók szűrésére és Hepatitis B vírus fertőzéssel kapcsolatos betegek diagnosztizálására szolgál.

Csak "in vitro" diagnosztikai használatra.

## B. BEVEZETÉS

A Hepatitis B vírus (HBV) egy burkos, kétszálú DNS vírus, amely a Hepadnaviridae családhoz tartozik és a fő oka a vérrel átvitt hepatitisnek a Hepatitis C vírussal (HCV) együtt. A HBV-vel való fertőzés klinikai manifesztációk egész sorát indukálja az enyhe inapparens betegségtől a fulmináns hepatitisig, krónikus, súlyos májbetegségekig, amely néhány esetben a máj cirrhosisához és karcinómához vezethet. A hepatitis B fertőzés osztályozása több szerológiai marker azonosítását igényli, amelyek a fertőzés három fázisa (inkubáció, akut és konvaleszcens) során exprimálódnak. Most több diagnosztikai tesztet használnak a betegség szűrésére, klinikai diagnózisára és managementjére. A Hepatitis B felszíni antigént vagy HBsAg-t korábban, mint Ausztrália antigént írtak le, a Hepatitis B vírus burkának legfontosabb proteinje. A felszíni antigén az "a" determináns tartalmazza, amely mindegyik ismert virális altípusnál általános, és immunológiailag két különböző alcsoportba osztható (ay és ad). A HBV-nak 10 fő szerotípusa van és 4 HBsAg altípust észleltek (adw, ady, ayw, ayr). A HBsAg 2-4 héttel az ALT szint abnormálissá válása előtt detektálható és 3-5 héttel azelőtt, hogy a tünetek jelentkeznek. A HBsAg szerológiai detektálása fontos módszer a HBV fertőzés diagnózisára és megelőzésére és az ELISA egy extenzíven alkalmazott analitikai rendszerré vált véradók szűrésére és fertőzött egyénekben a HBV klinikai diagnózisához.

## C. A TESZT ELVE

A HBsAg kimutatásához az EIAGEN HBsAg Kit antitest "sandwich" ELISA módszert használ, amelyben a poliszitirén mikroplate csíkok előzetesen be vannak vonva HBsAg-re specifikus monoklonális antitestekkel. A beteg szérum vagy plazmamintáját kell a mikroplate-hez adni. Az inkubáció során specifikus immunkomplex képződik abban az esetben, ha HBsAg van jelen a mintában, és hozzákötődik a szilárd fázishoz. Ezután a HBsAg különböző epitópjai ellen készített másodlagos antitestet, amely torna-peroxidáz enzimmel konjugált (HRP-konjugátum) kell hozzáadni a csövekhez. A második inkubációs lépés során ezek a HRP-konjugált antitestek kötődni fognak bármely, az első inkubáció során képződött anti-HBs-HBsAg komplexhez, és a nem kötődött HRP konjugátumot a mosás eltávolítja. A csövecskékhez ezután tetrametil-benzidin (TMB) és urea peroxid tartalmú kromogén oldatokat kell hozzáadni. Antitest-antigén-antitest(HRP) "sandwich" immunkomplex jelenlétében a szintelen kromogének a kötött HRP-konjugátum által kék-színű terméké hidrolizálódnak. A kék szín sárgává válik a reakció kénsavval történő leállítását követően. A színintenzitás mennyisége mérhető és arányos az antigén mennyiségével, amely a csövecskékbe került, és annak

mintában levő mennyiségével. Azon csövecskék, amelyek HBsAg negatív mintákat tartalmaznak, szintelenek maradnak.

## D. KOMPONENSEK

A kit tartalmaz reagenseket 96 teszthez (kód 071011), vagy 192 teszthez (kód 071012) vagy 480 teszthez (kód 071015).

<b>Mikroplate</b>	1
<b>Negatív kontrol</b>	1x1,5 mL/fiola
<b>Pozitív kontrol</b>	1x1,5 mL/fiola
<b>Konjugátum</b>	1x6 mL/fiola
<b>Teszt higító</b>	1x5 mL/fiola
<b>Szubsztrát oldat (A) Urea Peroxid</b>	1x6 mL/fiola
<b>Szubsztrát oldat (B) TMB</b>	1x6 mL/fiola
<b>Stop oldat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M)</b>	1x6 mL/fiola
<b>Mosópuffer koncentrárum 20x</b>	1x30 mL/fiola
<b>Plate zárófoliák</b>	2
<b>Műanyag lehegeszthető zacskó</b>	1
<b>Tesztek száma</b>	96
<b>Kód</b>	071011

<b>Mikroplate</b>	2
<b>Negatív kontrol</b>	1x1,5 mL/fiola
<b>Pozitív kontrol</b>	1x1,5 mL/fiola
<b>Konjugátum</b>	2x6 mL/fiola
<b>Teszt higító</b>	2x5 mL/fiola
<b>Szubsztrát oldat (A) Urea Peroxid</b>	2x6 mL/fiola
<b>Szubsztrát oldat (B) TMB</b>	2x6 mL/fiola
<b>Stop oldat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M)</b>	2x6 mL/fiola
<b>Mosópuffer koncentrárum 20x</b>	2x30 mL/fiola
<b>Plate zárófoliák</b>	3
<b>Műanyag lehegeszthető zacskó</b>	2
<b>Tesztek száma</b>	192
<b>Kód</b>	071012

<b>Mikroplate</b>	5
<b>Negatív kontrol</b>	4x1,5 mL/fiola
<b>Pozitív kontrol</b>	4x1,5 mL/fiola
<b>Konjugátum</b>	5x6 mL/fiola
<b>Teszt higító</b>	4x5 mL/fiola
<b>Szubsztrát oldat (A) Urea Peroxid</b>	5x6 mL/fiola
<b>Szubsztrát oldat (B) TMB</b>	5x6 mL/fiola
<b>Stop oldat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M)</b>	1x30 mL/fiola
<b>Mosópuffer koncentrárum 20x</b>	3x50 mL/fiola
<b>Plate zárófoliák</b>	6
<b>Műanyag lehegeszthető zacskó</b>	5
<b>Tesztek száma</b>	480
<b>Kód</b>	071015

### 1. Mikroplate:

A blank mikroplate csövek fixáltak a fehér csíktartóban. 12 csík 8 csövecskével, amelyek bevontak HBsAg-re reaktív monoklonális antitestekkel (anti-HBs).

A plate-k aluminium tasakba vannak csomagolva deszikkánsal együtt.

A mikroplate csíkokat törni lehet a szeparált használatához. A használatlan csíkokat tegye vissza a műanyag lehegeszthető tárolózacskóba, a deszikkánsal együtt és tegye vissza +2...8°C közé. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

## 2. Negatív Kontroll

Sárgás színű folyadék, természetes csavaros kupakkal rendelkező fiolában. Protein-stabilizált puffer, HBsAg-ra nem reaktívnek tesztelt.

Használatra kész a szállításkor. Tartósítószer tartalmaz. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

## 3. Pozitív Kontroll

Piros színű folyadék, piros csavaros kupakkal rendelkező fiolában. HBsAg hígítva protein-stabilizált pufferben.

Használatra kész a szállításkor. Tartósítószer tartalmaz. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

**Fontos megjegyzés:** Élő patogének hiánya a pozitív kontrollban nem teljesen zárható ki, ezáltal a kontrollt potenciálisan veszélyesként kell kezelni, a GLP-vel összhangban.

## 4. Konjugátum

Piros színű folyadék, fehér fiolában, zöld csavaros kupakkal. Torma-peroxidáz-konjugált anti-HBs antitestek. Használatra kész a szállításkor. Tartósítószer tartalmaz. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

## 5. Teszt hígító

Zöld színű, pink csavaros kupakos fiolában van. Szérum alapú, kazein és szukroz oldat.

Használatra kész a szállításkor. Tartósítószer tartalmaz. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

## 6. Szubsztrát oldat "A"

Színtelen folyadék, fehér fiolában, szürke csavaros kupakkal.

Urea peroxid oldat.

Használatra kész a szállításkor. Tartósítószer tartalmaz. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

## 7. Szubsztrát oldat "B"

Színtelen folyadék, fekete fiolában, fekete csavaros kupakkal.

TMB (Tetrametil-benzidin oldat)

Használatra kész a szállításkor. Tartósítószer tartalmaz. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

**Megjegyzés:** Fénytől védve tárolandó mivel erős sugárzásra érzékeny.

## 8. Stop Oldat

Színtelen folyadék, fehér fiolába, piros csavaros kupakkal.

Hígított kénsav oldat (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Használatra kész a szállításkor. Tartósítószer tartalmaz. Ha már kinyitotta, stabil egy hónapig +2...8°C között.

**Az MSDS rendelkezésre áll a laboratóriumi személyzet kérése esetén.**

## 9. Mosópuffer koncentrátum 20x

Színtelen folyadék, átlátszó palackban, természetes csavaros. PH 7,4 20 x PBS.

A koncentrátumot hígítani kell 1:20 arányban desztillált/deionizált vízzel használat előtt.

Ha már feloldotta, stabil egy hétig szobahőmérsékleten, vagy két hétig +2...8°C között.

## E. SZÜKSÉGES, DE A KIT ÁLTAL NEM TARTALMAZOTT ANYAGOK

1. Kalibrált mikropipetták 20, 50 és 100 µL és eldobható műanyag hegyek.
2. EIA szintű víz (duplán desztillált vagy deionizált, szén kezelt fertőtlenítőként használt oxidáló vegyületek eltávolítására).
3. Mérőóra 60 perces vagy hosszabb tartománnyal.
4. Abszorbens papírtörtek.
5. Kalibrált ELISA mikroplate termosztatikus inkubátor +37°C ± 0,5°C képességgel.
6. Kalibrált ELISA mikrocsovecske reader 450 nm (leolvasás) és, ha lehetséges 620-630 nm (blanking) filterekkel.
7. Kalibrált ELISA mikroplate mosó.
8. Vortex vagy hasonló keverőeszközök.

## F. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ELŐVIGYÁZATOSSÁG

1. A kitet képzett és megfelelően betanított személyzet használhatja csak laboratóriumért felelős orvos felügyelete alatt.  
Ezt a csomagolási előíratot figyelmesen el kell olvasni a termék használatát megelőzően.
2. A kitet ezen terület nemzeti hatósága (Eü. Minisztérium vagy hasonló hatóság) által bizonylatolt és minősített laboratóriumban kell használni ezen típusú vizsgálat kivitelezéséhez.
3. A teszt kivitelezésében részt vevő személyzetnek laboratóriumi védőruhát, por-mentes kesztyűt és szemüveget kell viselnie. El kell kerülni éles/hegyes (tűk) vagy vágó (pengék) eszközök használatát. A teljes személyzetet képezni kell biobiztonság tekintetében, ahogy az a Center for Disease Control, Atlanta, U.S. ajánlja és le van írva a következő National Institute of Health's publication-ban: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. A mintakezelésbe bevont teljes személyzetet be kell oltani HBV-ra és HAV-ra, amelyre vakcinák elérhetőek, biztonságosak és hatékonyak.
5. A laboratóriumi környezetet ellenőrizni kell, elkerülendő olyan kontaminációkat, mint por, lebegő mikrobiális részecskék a kit fioláinak és mikroplate-inek nyitáskor, és a teszt végzésekor. Védje a szubsztrát oldat B-t (TMB) erős fénytől és kerülje el a munkafelület rázkódását a teszt elvégzésének helyén.
6. Előírat alapján a kitet +2...8°C között tárolja hőmérséklet-ellenőrzött hűtőben vagy hidegszobában.
7. Ne keverje a különböző sarzszámú kit komponenseket. Ajánlott, hogy a két kit között az azonos sarzszámú komponenseket se keverje össze.
8. Ellenőrizze, hogy a reagensek tiszták-e, és nem tartalmaznak látható nehéz részecskéket vagy aggregátumokat. Amennyiben ez nem megfelelő javasolja a laboratórium felügyelőjének, hogy intezze a kit cseréjét.
9. Kerülje el a kereszt-kontaminációt eldobható pipettahegyek használatával és azok cseréjével minden minta után.
10. Kerülje el a kereszt-kontaminációt a kit reagensek között eldobható pipettahegyek használatával és azok cseréjével mindegyiknek a használata után.

11. Ne használja a kitet a külső (kartondoboz/másodlagos konténer) és belső (fiolák) címkéken feltüntetett lejárató idő után.
12. Minden mintát potenciálisan fertőzőtként kezeljen. Minden human széruminat Biosafety Level 2-n kell kezelni, mint azt a Center for Disease Control, Atlanta, U.S. ajánlja egyetértésben azzal, ami jelölve van az Institutes of Health's következő publikációjában: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984. A kit Negatív kontrolljának készítéséhez emberi eredetű anyagot használhat fel. Ezen anyagokat HIV1/2, HCV, TP antitestekre és HBsAg-re az elfogadott jellemzőjű tesztitekkel vizsgálták és negatívnak találták. Mindazonáltal nincs analitikai módszer, amely biztosítja, hogy a mintákban vagy reagensekben teljesen hiányzanak a fertőző ágensek. Ezáltal kezelje a reagenseket és a mintákat extrém odafigyeléssel, mintha azok fertőző betegségek átvitelére lennének képesek. A pozitív és negatív kontrollok stabilizálásához bovin eredetű szérumot használtak. A bovin szérum albumin (BSA) és a fetális borjú szérum (FCS) BSE/TSE mentes földrajzi területek állataiból származnak.
13. Eldobható műanyag áru használata ajánlott a mosóoldat elkészítésénél vagy a komponensek automata munkaállványban másik tartóba való átvitelénél a kontamináció elkerülésének céljából.
14. A kit használata során képződött hulladékot a nemzeti irányvonalaknak és a kémiai és biológiai természetű laboratóriumi hulladékokra vonatkozó szabályozóknak megfelelően kell megsemmisíteni. Főleg a mosási folyamatból, a kontrollok és minták maradékából származó folyadék-hulladékot kell potenciálisan fertőző anyagként kezelni és inaktiválni. Az inaktiváció javasolt folyamatai a kezelés 10%-os végkoncentrációjú háztartási ehéritővel 16-18 órán keresztül vagy hőinaktiválás autoklávban 121°C-on, 20 percig.
15. A véletlenszerű kifröccsenéseket házi fehérítővel átitatott papírtörülkövel fel kell itatni, majd vízzel lemosni. A törülköt ezután meg kell semmisíteni a laboratóriumi/kórházi hulladékhoz kijelölt megfelelő konténer segítségével.
16. A Stop oldat 0,5M kénsavat tartalmaz. Kerülje a bőrrel és szemmel való érintkezést. Kontaktus esetében, öblítse ki azonnal nagy mennyiségű vízzel.
17. A ProClin TM 300 0,1%-os anyag tartósítószerként használt, a bőr érzékenységét okozhatja. Itassa fel a kifröccsenéseket azonnal, vagy mossa vízzel, ha bőrrel vagy szemmel kapcsolatba kerül.
18. Ne dohányozzon, egyen igyon vagy ne alkalmazzon kozmetikumokat azon a területen, ahol a mintákat vagy a kit reagenseket használja.
19. Más hulladék anyagokat, amelyek a kit használata során keletkeznek (pl. mintákhoz és kontrollokhoz használt pipettahegyek, használt mikroplate-k) potenciálisan fertőzőként kell kezelni és a nemzeti szabályozók és laboratóriumi hulladékokra vonatkozó előírások alapján meg kell semmisíteni.
20. Ne pipettázzon szájjal.

## G. MINTA: ELŐKÉSZÍTÉS ÉS JAVASLATOK

### 1. Mintagyűjtés

Nem szükséges speciális beteg-előkezelés. Gyűjtse a mintát normál laboratóriumi gyakorlat szerint. Friss szérumot vagy plazmamintát lehet használni ehhez a teszthez. A vénapunkcióval gyűjtött vért hagyni kell természetesen és teljesen megalvadni – a szérumot/plazmát el kell választani az alvadéktól, amilyen hamar csak lehet, hogy elkerülhető legyen a vvt hemolízis. Figyelni kell arra, hogy a szérum minták tiszták és nem kontamináltak mikroorganizmusokkal. Bármilyen látható részecskét el kell távolítani a mintából 3000 rpm-en (forulat / perc) 20 percig történő centrifugálással szobahőmérsékleten vagy szűréssel.

2. EDTA-ban nátrium-citrátba vagy heparinba gyűjtött plazmamintákat lehet tesztelni, de **erősen lipémiás, icterusos vagy hemolitikus mintákat nem szabad használni**, mivel azok fals eredményt adhatnak a tesztben. **Ne hőinaktiválja a mintákat.** Ez a cél-analízis romlását okozhatja. Olyan minták, amelyekben látható mikrobiális szennyeződés van, sohasem használhatóak.
3. Az EIAgen HBsAg Kit CSAK egyedi szérum és plazma és minták vizsgálatára alkalmas. Ne használja a tesztet cadaver minta, nyál, vizelet vagy más testfolyadékok vagy poolozott (kevert) vér vizsgálatára.
4. **Szállítás és tárolás:** Tárolja a mintákat +2...8°C között. 7 napon belüli tesztelés esetén a mintákat nem kell lefagyasztani (-20°C vagy alacsonyabb). El kell kerülni a többszöri lefagyasztási-felolvasztási ciklusokat. Szállításhoz a mintákat a klinikai minták és etológiai ágensek létező helyi és nemzetközi szabályzásai szerint kell csomagolni és címkézni.

## H. KOMPONENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

A kit komponensei stabilak maradnak a címkén és a csomagoláson található lejárató ideig +2...8°C között tárolva, nem lefagyasztva. Az EIAgen HBsAg Kit maximális teljesítményének biztosításához, a tárolás során védje a reagenseket mikroorganizmus vagy kemikáliák általi kontaminációtól.

### 1. Mikroplatek:

Engedje, hogy a mikroplate elérje a szobahőmérsékletet (18...30°C) kb. 1 óra mielőtt kinyitja a tartóját.

A fel nem használt csíkokat vissza kell helyezni az alumínium tasakba szorosan visszazárva és +2...8°C között tárolva. Első alkalommal történő kinyitáskor a maradék csíkok stabilak egy hónapig +2...8°C között.

### 2. Negatív kontroll:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

### 3. Pozitív kontroll:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Ezt a komponenst potenciálisan fertőzőként kezelje.

### 4. Konjugátum:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.



Legyen óvatos, hogy ne szennyezze a folyadékot oxidáló vegyületekkel, levegő-szállított porral vagy mikrobákkal. Ha a komponenst transzferálni kell, csak műanyag lehetőség szerint steril, eldobható konténert használjon.

#### 5. Teszt hígító:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

#### 6. Szubsztrát oldat "A" és "B":

Használatra kész komponens. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

Kerülje el a folyadék kontaminációját oxidáló vegyületekkel, levegő-szállított porral vagy mikrobákkal. Ne tegye ki erős besugárzásnak, oxidáló ágenseknek és fém felszínnek. Ha ezt a komponenst transzferálni kell, csak műanyag lehetőség szerint steril, eldobható konténert használjon.

#### 7. Stop oldat:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

#### 8. Mosópuffer koncentrátum 20x (30 mL-es fiola)

A 20x-os koncentrált oldat teljes tartalmát desztillált/deionizált vízzel kell hígítani 600 mL-re (1000 mL-re az 50 mL-es fiola esetén), a térfogatot jelzi a címke, finomat megkeverni elejétől a végéig használat előtt. Mivel kristályok lehetnek jelen a fiolában, figyeljen arra, hogy az egész tartalmat feloldja az oldat készítésekor. Az előkészítésben kerülje el a habosodást, mivel buborékok jelenléte rossz mosási hatásokhoz vezethet.

**Megjegyzés: Ha már hígítva van, a mosóoldat stabil 1 hétig +2...8°C között.**

### I. KÉSZÜLÉKEK ÉS ESZKÖZÖK A KIT HASZNÁLATÁVAL KAPCSOLATOSAN

1. A mikropipettákat kalibrálni kell, hogy a teszt által megkívánt korrekt térfogatot szállítsák és rendszeres dekontaminációnak kell alávetni azokat (háztartási alkohol, 10%-os fehérítő oldat, Kórház-szintű fertőtlenítőszer) a részeket, amelyek véletlenszerűen kontaktálódhatnak a mintával. Rendszeresen karban is kell őket tartani. A kifröccsenések és kit komponensek maradékainak dekontaminálását is rendszeresen el kell végezni. Szintén rendszeres karbantartás kell ahhoz, hogy 1% precizitást és  $\pm 2\%$  eltérést mutassanak. A kicseppenések és a kit maradékainak dekontaminálását rendszeresen el kell végezni.
2. Az ELISA inkubátort +37°C-re kell beállítani ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$  toleranciával) és rendszeresen megbizonyosodni arról, hogy tartja a korrekt hőmérsékletet. Mind száraz inkubátorok, mind vízfürdők alkalmasak az inkubáláshoz, amennyiben a készülék validált ELISA tesztek inkubálására.  
UTASÍTÁSOK A MOSÁSHOZ
3. Az ELISA mosó is extrém módon fontos a teszt teljes kivitelezéséhez.
  - A jó mosási folyamat szükséges korrekt és precíz analitikai eredmények eléréséhez.
  - Ezáltal ajánlott jó minőségű ELISA mikroplate mosó használata, fenntartva a mosás kivitelezésének legjobb szintjét. Általánosságban

nem kevesebb, mint 5 automata mosási ciklus (350-400  $\mu\text{L}$ /csövecske) elegendő a fals pozitív eredmények és a magas háttér elkerüléséhez.

- A plate mintával vagy HRP-konjugátummal való kereszt-kontaminációját elkerülendő az inkubációt követően ne öntse ki a csövecskék tartalmát, hanem engedje, hogy a plate-mosó automatikusan kiszívja azt.
  - Bizonyosodjon meg arról, hogy a mikroplate mosó folyadék-elosztó csatornái nem blokkoltak vagy kontamináltak és elegendő térfogatú Mosópuffer kerül minden alkalommal a csövecskékbe.
  - Kézi mosás esetén ajánlott **5 mosóciklus** elvégzése, 350-400  $\mu\text{L}$ /csövecske bejuttatásával és **5-szori** kiszívásával. Gyenge eredmények észlelése esetén (magas háttér) növelje a mosási ciklusok számát vagy az áztatási időt csövecskékként.
  - Bármely esetben, ha folyadék kikerül, a csíkokat 2,5% végkoncentrációjú nátrium hipoklorit oldattal kell kezelni 24 órán keresztül, mielőtt azokat megfelelő módon megsemmisíti.
  - A koncentrált Mosópuffert használat előtt 1:20 arányban hígítani kell. Ha kevesebb, mint a teljes plate-t használja az oldat arányos mennyiségét készítse el.
4. Az ELISA mikroplate readert 450 nm-es leolvasófilterrel kell szállítani és ideálisan egy másik filterrel (630 nm) blankolási célokhoz. A standard kivitelezéseknek a következőknek kell lenniük: (a) sáv szélesség  $\leq 10$  nm; (b) abszorbancia tartomány 0 tól  $\geq 2,0$ ; (c) linearitás  $\geq 2,0$ -ig; ismételhetőség  $\geq 1\%$ . A blankolást az "Eljárás menete" fejezetben azonosított csövecskén kell elvégezni. A reader optikai rendszerét rendszeresen kell kalibrálni, hogy megbizonyosodjon a megfelelő optikai denzitás mérésében. Ezt rendszeresen karban kell tartani a gyártó utasításai alapján.
  5. ELISA automata munkaállomás használata esetén minden kritikus lépést (cseppentés, inkubálás, mosás, leolvasás, rázás, adatkezelés) figyelmesen be kell állítani, kalibrálni, ellenőrizni és rendszeresen szervizelni, acélból, hogy az O fejezetben levő Belső Minőségügyi Ellenőrzés adataihoz illeszkedjen. A teszt kivitelezését az egység működtető rendszerére kell installálni és validálni azt a mosóra és a leolvasóra. Továbbá az állomás folyadék-kezelő részét (cseppentés és mosás) validálni kell és megfelelően beállítani. Különleges figyelmet kell fordítani arra, hogy elkerülje a mintacseppentéshez és mosáshoz használt tűk általi anyagátvitelt. Ezt tanulmányozni kell és ellenőrizni, hogy minimalizálható legyen a csövecskék kontaminációs lehetősége az erősen reaktív minták által, ami fals pozitív reakcióhoz vezetne. Az ELISA automata munkaállomás javasolt vér elemzéséhez, ha az egyszerre vizsgálendő minták száma meghaladja a 20-30-at. Teljes automata készülék használata esetén az inkubáció során ne fedje le a plate-ket a plate fedővel. A plate-ben maradt anyag kicsapátása a mosás után szintén elhagyható.

## L. TESZT ELŐTTI KONTROLLOK ÉS TEVÉKENYSÉGEK

1. Ellenőrizze a kit lejáratát, amely a külső címkére van nyomtatva. Ne használja, ha lejárt.
2. Ellenőrizze, hogy a folyékony komponensek nem kontaminálódtak-e látható részecskékkel vagy aggregátumokkal. Ellenőrizze, hogy a Szubsztrát oldat "A" és "B" színtelen vagy halvány kék, úgy, hogy felszívja azt steril műanyag pipettával. Ellenőrizze, hogy nem tört össze semmi sem a szállítás során és nincs kifröccsent folyadék a dobozon belül. Ellenőrizze, hogy az alumínium tasak, amely a mikroplate-t tartalmazza és nincs megszűrve és nem károsodott.
3. Hígítsa meg a 20x koncentrált Mosópuffer teljes mennyiségét a fentiekben leírtak szerint.
4. Engedje, hogy mindegyik többi komponens elérje a szobahőmérsékletet (18...30°C) kb. 1 óra és aztán keverje meg azokat a leírás szerint.
5. Állítsa be az ELISA inkubátort +37°C-ra és készítse elő az ELISA mosót a hígított mosóoldatos priminggal a gyártói utasítások szerint. Állítsa be a mosóciklusok pontos számát, ahogy az I.3. fejezetben található.
6. Ellenőrizze, hogy az ELISA reader legalább 20 perccel a leolvasás előtt be lett kapcsolva.
7. Automata munkaállomást használva, azt kapcsolja be, ellenőrizze a beállításokat és legyen biztos abban, hogy a helyes teszt protokollt használja.
8. Ellenőrizze, hogy a mikropipetták a kívánt értékre vannak beállítva.
9. Ellenőrizze, hogy minden más készülék rendelkezésre áll és használatra kész.
10. Problémák esetén ne dolgozzon tovább a teszttel és kérve a supervisor tanácsát.

## M. AZ ELJÁRÁS MENETE

A tesztet az alábbiakban leírtak alapján kell végezni, figyelve arra, hogy a tesztelés során minden mintánál ugyanazt az inkubációs időt tartsa be.

### KÉZI VIZSGÁLAT:

1. **Előkészítés:** Jelöljön meg 3 csövecskét, mint Negatív kontroll (pl. **B1, C1, D1**), 2 csövecskét, mint Pozitív kontroll (pl. **E1, F1**) és egyet Blank-nek (pl. **A1**), sem mintát, sem Konjugátumot nem szabad a Blank csövecskébe tenni). Ha az eredményeket két hulumhosszos plate leolvasóval határozza meg, akkor a Blank csövecske használata nem követelmény. Csak a teszthez szükséges csíkokat használja.
2. **A hígító hozzáadása:** Adjon **20 µL** teszthígítót mindegyik csövecskébe a Blank kivételével.
3. **A minta hozzáadása:** Adjon **100 µL** Pozitív kontrollt, Negatív kontrollt és mintát a megfelelő csövecskébe a Blank kivételével. **Megjegyzés: használjon más eldobható pipettahegyet minden mintához, a Negatív kontrollhoz, Pozitív kontrollhoz, hogy elkerülje a kereszt-kontaminációt. Keverje meg finom ütögetéssel a plate-t.**
4. **Inkubálás:** Fedje le a plate-t plate fedővel és inkubáljon **60 percig +37°C-on**.
5. **A konjugátum hozzáadása:** Az inkubáció végén vegye le és dobja el a plate fedőt. Adjon **50 µL** Konjugátumot minden csövecskébe a Blank kivételével. Keverje meg finom ütögetéssel a plate-t.

6. **Inkubálás:** Fedje le a plate-t plate fedővel és inkubáljon **30 percig +37°C-n**.
7. **Mosás:** Inkubációt követően távolítsa el a plate fedőt. Mossa mindegyik csövecskét **5-ször** hígított Mosópufferrel. Mindegyik alkalommal engedje, hogy a csövecskék **30-60 másodpercig** öblítődjenek. Az utolsó mosási ciklus után borítsa rá a plate-t szűrőpapírra vagy tiszta töröltre, és csapasson ki minden maradékot (I.3. fejezet szerint).
8. **Színezés:** Adjon **50 µL** Szubsztrát oldat "A"-t és **50 µL** Szubsztrát oldat "B"-t mindegyik csövecskébe, a blanket is beszámítva. Inkubálja a plate-t **37°C-on, 30 percig fénytől mentesen**. Az enzimatis reakció a Szubsztrát oldatok és a Konjugátum között kék színt eredményez a Pozitív kontrollban és a HBsAg pozitív mintákat tartalmazó csövecskében.
9. **Leállító reakció:** Többszörös pipette használatával vagy manuálisan adjon **50 µL** leállító oldatot minden csövecskébe és finoman keverje meg. Intenzív sárga szín fejlődik ki a pozitív kontrollokban és HBsAg pozitív mintát tartalmazó csövecskében.
10. **Az abszorbancia mérése:** Kalibrálja a plate reader a blank csövecskével szemben, és olvassa le az abszorbanciát **450 nm-n**. Dual filter készülék használata esetén állítsa a reference hullámhosszat **630 nm-re**. Számítsa ki a Cut-off értéket és értékelje az eredményeket. **(Megjegyzés: olvassa le az abszorbanciát a reakció leállítását követő 10 percen belül.)**

### Fontos megjegyzések:

1. *Ha a második filter nem áll rendelkezésre, bizonyosodjon meg arról, hogy a mikroszó alján nincs ujjlenyomat a 450 nm-es leolvasás előtt. Az ujjlenyomatok fals pozitív eredményeket okozhatnak a leolvasásánál.*
2. *A leolvasást ideálisan a Stop oldat hozzáadását követően, azonnal meg kell tenni, de nem később, mint 10 perccel azután. A szubsztrátnak néminemű ön-oxidációja jöhet létre a magas háttér miatt.*

## N. TESZTSÉMA

LÉPÉSEK	FOLYAMATOK
Minta hígító	20 µL
Kontrollok és minták	100 µL
<b>Első inkubáció</b>	<b>60 perc</b>
Hőmérséklet	+37°C
Konjugátum	50 µL
<b>Második inkubáció</b>	<b>30 perc</b>
Hőmérséklet	+37°C
Mosási lépés	5 ciklus (ld. I.3. fejezet)
Szubsztrát "A"	50 µL
Szubsztrát "B"	50 µL
<b>Harmadik inkubáció</b>	<b>30 perc (fényt kerülve)</b>
Hőmérséklet	+37°C
Leállító oldat	50 µL
Leolvasás OD	450/630 nm

A diszpenzációs séma mintáját mutatja az alábbi táblázat (mindkét inkubációs idejű folyamatra érvényes):

### Mikroplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3										
B	NC	S4										
C	NC	S5										
D	NC	S6										
E	PC	S7										
F	PC	S8										
G	S1	S9										
H	S2	S10										

Leírás: BLK = Üres NC = Negatív kontroll  
PC = Pozitív kontroll S = Minta

### O. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

A teszteredmények akkor érvényesek, ha a Minőségellenőrzési követelmények kielégítettek. Ajánlott, hogy minden laboratórium állítson fel megfelelő minőségi kontroll rendszert a vizshálandó betegmintához hasonló vagy azonos minőségellenőrző anyagokkal.

- A Blank csövecské A értéke, amely csak Kromogént és Stop oldatot tartalmaz <0,080 450 nm-en.
- A Pozitív kontroll A értéke kell, hogy  $\geq 0,800$  legyen 450/630 nm-en vagy 450 nm-en blankolás után.
- A Negatív kontroll A értéke kell, hogy <0,100 legyen 450/630 nm-en vagy 450 nm-en blankolás után.

Amennyiben a Negatív kontroll A értékek egyike nem elégíti ki a minőségellenőrzési követelményeket, azt el kell dobni, és az átlagot a maradék két érték használatával kell kalkulálni. Ha több, mint egy Negatív kontroll érték A nem elégíti ki a minőség ellenőrzési tartományt, a teszt érvénytelen, és meg kell ismételni.

Amennyiben a teszt eredményei kielégítik a fenti állapotokat, folytassa a következő fejezettel.

Amennyiben nem, ne folytassa és végezze el a következő ellenőrzéseket.

Problémák	Ellenőrzés
<b>Blank cső</b> $\geq 0,080$ OD450 nm-en	1. hogy a Szubsztrát oldat nem kontaminálódott a teszt során
<b>Negatív kontroll (NC)</b> $\geq 0,100$ OD450/630-en vagy 450 nm-en blanking után	1. hogy a mosási eljárás és a mosó beállítások validáltak az előkvalifikációs tanulmányban; 2. hogy a megfelelő mosóoldatot használták és a mosót prime-olták azzal használat előtt; 3. hogy nem csináltak hibát a teszt folyamatában (pozitív kontroll becseppentése negatív kontroll helyett); 4. hogy a negatív kontroll kontaminációja vagy a csövecskéké, ahová a kontroll cseppentve van, jelentkezett a pozitív minták fröccsenése vagy a konjugátumba jutása miatt, 5. hogy a mikropipetták nem kontaminálódtak pozitív mintákkal vagy konjugátummal 6. hogy a mosó tűi nem dugultak vagy részlegesen elzáródtak.

<b>Pozitív kontroll</b> < 0,800 OD 450/630 nm-en vagy 450 nm-en a blanking után	1. hogy a folyamat megfelelően lett elvégezve; 2. hogy nem csináltak hibát a teszt folyamatában (negatív kontroll becseppentése pozitív kontroll helyett); 3. hogy a mosási eljárás és a mosó beállítások validáltak az előkvalifikációs tanulmányban; 4. hogy a pozitív kontrollnak semmilyen külső kontaminációja nem jelentkezett.
---	--

Amennyiben a fenti problémák bármelyike jelentkezik, jelentse a problémát a supervisornak további teendőik végett.

### P. EREDMÉNYEK

Minden mikroplate-nek függetlennek kell tekinteni a teszt eredményeinek számolásakor és értékelésekor tekintet nélkül a processzált plate-k számára. Az eredmények számolása minden mintához tartozó abszorbancia (A) értékeknek a plate Cut-off (C.O.) értékhez való viszonyításával történik. Ha a Cut-off érték egy filteres plate readeren alapszik, az eredményeket a Blank csövecské A értékének a minták és kontrollok nyomtatási értékeiből való levonásával kell számolni. Ha a leolvasás dual-filteres plate leolvasóval történik, akkor a Blank csövecské A értékét nem kell levonni a minták és kontrollok nyomtatási értékeiből.

$$\text{Cut Off (C.O.)} = \text{NC átlag} + 0,06$$

A teszthez talált, az eredmények interpretálásához használatos értékek a következő fejezetben vannak leírva.

Számolási minta az alábbiakban látható.

### Példa:

#### 1. Minőségi kontroll

Blank csövecské A érték: A1 = 0,025 450 nm-en (Megjegyzés: blanking csak akkor szükséges, ha egy filterrel történik a leolvasás 450 nm-en)

**Csővecské száma:** B1 C1 D1  
Negatív kontroll A blankolás után: 0,020 0,012 0,016

**Csővecské száma:** E1 F1  
Pozitív kontroll A blankolás után: 2,421 2,369  
Minden kontroll érték a minőségi kontroll tartományon belülnek tekintendő

**2. Az Nc számolása:**  $= (0,020+0,012+0,016)/3=0,016$

**3. A Cut-off számolása (C.O.):**  $= 0,016 + 0,06=0,076$

### Q. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

#### Negatív eredmények (A / C.O. < 0,9)

Azon minták, amelyek a Cut-off értéknél kisebb abszorbanciaértéket adnak erre a tesztre nézvést negatívak, amely azt jelenti, hogy nincs detektált Hepatitis B vírus felszíni antigén EIAGEN HBsAg Kittel, ezáltal a beteg feltehetően nem fertőzött HBV-vel és a vér egység nem tartalmaz hepatitis B vírus felszíni antigént, és transzfundálható abban az esetben, ha ha

más fertőző betegségek markerei szintén hiányoznak.

**Pozitív eredmények** (A / C.O. > 1,1)

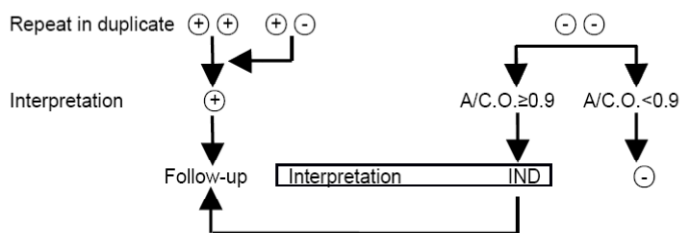
Azon minták, amelyek abszorbanciája egyenlő vagy nagyobb a Cut-off értéknél eredendően reaktívnak tekintendők, amely azt jelenti, hogy a hepatitis B vírus felszíni antigén feltehetően detektálni lehetett az EIAgen HBsAg Kittel. Minden eredendően reaktív mintát újra kell tesztelni duplikátumban EIAgen HBsAg Kittel a végső teszteredmény-interpretálás előtt. Az ismételt reaktív mintákat pozitívnak kell tekinteni hepatitis B vírus felszíni anigénre. EIAgen HBsAg Kittel.

**Határérték** (A / C.O. = 0,9-1,1)

Azon minták, amelyek abszorbanciája a Cut-off-hoz viszonyítva 0,9-1,1 arányú, határértékűnek tekintendők és ezen mintákat duplikátumban újra kell tesztelni a kezdeti eredmény megerősítése végett.

**Követés, megerősítés és kiegészítő tesztelése minden pozitív mintának más analitikai rendszerrel is (pl. PCR) megkívánt. A klinikai diagnózist nem szabad felállítani egyszeri teszteredmény alapján. A klinikai és más laboratóriumi adatokat és eredményeket integrálni kell.**

**INITIAL RESULTS INTERPRETATION AND FOLLOW-UP  
ALL INITIALY REACTIVE OR BORDERLINE SAMPLES**



IND= nem interpretálható

Amennyiben a kezdetben reaktív minta újratestelése után, mindkét csövecskében negatív eredmény van (A/C.O. <0,9), ezen mintákat nem megismételhető pozitívnak kell tekinteni (vagy fals pozitívnak) és negatívnak kell feljegyezni. Sok nagyon szenzitív ELISA teszt esetén fals pozitív eredmények jelentkezhetnek több okból adódóan, azok legtöbbje kapcsolatos, bár nem kizárólagosan a nem megfelelő mosási lépésekkel. Több információ a "Problémamegoldás" (S fejezet) részben található.

Amennyiben a duplikátumos újratestelést követően wegy vagy mindkét csövecske pozitív eredményű, ezen ELISÁ-val a végső eredményt ismételt pozitívnak kell tekinteni. Ismételt reaktív minták pozitívnak tekintendők hepatitis B vírus felszíni antigénre és ezáltal a beteg feltehetően fertőzött HBV-vel és a véregységet ki kell dobni.

Duplikátumban történő újratestelés után a Cut-off értékhez közeli mintákat figyelmeztetéssel kell interpretálni és "határérték" zónájú vagy a teszt idejében értékelhetetlen mintának kell tekinteni.

**Fontos megjegyzések:**

1. Az eredmények értékelését a laboratóriumi felelős ellenőrzése alatt kell végezni, csökkentendő a megítélési hibákat és félreértékeléseket.
2. Amikor a teszteredményeket a laboratóriumból más részlegre juttatják, figyelni kell arra, hogy elkerüljék a hibás adatátvitelt.

3. A vírusos hepatitis infekció diagnózisát minősített orvosnak kell megtennie és kibocsátania a beteg felé.

**R. KIVITELEZÉSI JELLEMZŐK**

A kivitelezések értékelését a Common Technical Specifications-ban (CTS) jelentettek alapján kell elvégezni, mint ahogy az megkívánt az art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC-ben.

A kivitelezési értékelést a Paul-Ehrlich-Intézetben (PEI), a Német Vöröskereszt Baden-Württemberg – Hessen Intézetében és három vérellátóban kell elvégezni, a következő EIAgen HBsAg Kit kivitelezési jellemzőket demonstrálva.

**1. SPECIFICITÁS**

Európai véradók értékelésekor (n=5038) a kit teljes diagnosztikai specificitása 99,78% volt.

Többcentrumú kiértékelés (A,B,C helyek) esetében az EIAgen HBsAg Kit demonstrált specificitása 99,92% volt.

Laboratórium	Szám	EIAgen HBsAg Kit		Specificitás
		-	+	
"A" vérellátó	1958	1955	3	99.85%
"B" vérellátó	2518	2516	2	99.92%
"C" vérellátó	6344	6340	4	99.94%
Teljes	10820	10811	9	99.92%

**2. SENZITIVITÁS**

Az EIAgen HBsAg Kit értékelése szenzitivitás tekintetében 22 kereskedelmihez hozzáférhető HBV szerokonverziós panelen és összesen 403 HBsAg pozitív - magában foglalva a Paul Ehrlich Institutnál rendelkezésre álló 146 HBsAg HBV genotipizált és HBsAg szubtipizált plazmamintán történt. A szerokonverziós szenzitivitásra tekintettel az EIAgen HBsAg Kit a 22 HBV szerokonverziós panelen a kurrens, CE jelzett, PEI általi adatbankban benne levő HBsAg szűrőtesztek sorával legalább ekvivalens szenzitivitási szintet mutatott. 10 járulékos szerokonverziós panelt házon belül teszteltek. A szerokonverziós szenzitivitás összehasonlítható volt más CE-jelölt HBsAg screening tesztjével. Az EIAgen HBsAg Kit diagnosztikai szenzitivitás szempontjából minden pozitív mintát pozitívnak detektált, magában foglalván az A-F HBV genotípusokat vagy a vizsgált HBsAg altípusokat.

Összegezve, az EIAgen HBsAg kit teljes eredménylistája szerokonverziós szenzitivitás tekintetében összehasonlítható volt más CE jelzésű HBsAg kitekével, amelyekről a PEI-nek adatai vannak és mind a 403 HBsAg minta reaktív volt, 100%-os teljes szenzitivitást adva.

**3. ANALÍTIKAI SENZITIVITÁS**

0,1 IU/mL (NIBSC 00/588)

**4. ANALÍTIKAI SPECIFICITÁS**

Nem volt megfigyelhető interferencia sem azon betegeknél, akiknek magas szintű a rheumafaktora sem terhes nőknél. Ugyanazon a napon és fagyasztott mintákat teszteltek a gyűjtés és tárolás interferenciáinak ellenőrzése céljából. Összesen 100, anti-HBc-re, anti-HCV-re és anti-HIV-1-re reaktív mintát vizsgáltak HBsAg-re EIAgen HBsAg Kit-tel A 100-ból 98 minta negatív volt HBsAg-re. Betegektől származó 200 vérmintát szintén teszteltek EIAgen HBsAg Kit-tel. A 200-ból 191-nek negatív szűrési eredménye volt HBsAg-re. A 9-ből 8

kezdetben reaktív szűrési eredmény megismételve is reaktív eredményű volt EIAGEN HBsAg Kit-tel, de egyik esetben sem nyert bizonyítást hepatitis B virus jelenléte.

### 5. MUTÁCIÓK DETEKTÁLÁSA

108 mintából álló, PCR-rel szekvenált panelt teszteltek, acélból, hogy az EIAGEN HbsAg Kit kivitelezési jellemzőjét bemutassák HbsAg mutációk tekintetében. Az eredmények az alábbi táblázatban láthatóak.

Háttér	Szám	EIAGEN HBsAg Kit
adr (+)	35	33
	4 mutáció	4
adw (+)	37	34
	16 mutáció	24
ayw (+)	2	2
	2 mutáció	2
ayr (+)	2	2
Teljes	108	101

### 6. REPRODUCIBILITÁS

Reproducibilitás		Teszten belüli		Tesztek közötti	
Minta típusa	n	Átlag OD	CV%	Átlag OD	CV%
0.1IU/mL HBsAg	10	0.155	10.6%	0.150	11.0%
Gyenge pozitív	10	0.457	9.0%	0.432	9.5%
Közepesen pozitív	10	1.572	7.0%	1.437	7.5%
Erősen pozitív	10	2.327	4.2%	2.302	4.4%
Pozitív kontroll	10	2.322	4.1%	2.315	4.2%

### S. JAVASLATOK PROBLÉMAMEGOLDÁSHOZ

Kapcsolódván a tesztfolyamathoz és a specifikációkhoz is a reagensek korrekt használata és a megfelelő pipettázás által elkerülhetőek a következő típusú hibák.

HIBA	LEHETSÉGES OKOK/JAVASLATOK
OD nagyon különbözők (± 50%) a leírt QC-tól	- a reagensek nem megfelelő becseppentési térfogata (javaslat: ellenőrizze a becseppentett térfogat és a teszt által megkövetelt térfogat egyezőségét: recalibrálja a pipettát) - a nem megfelelő hőmérséklet vagy inkorrekkt inkubációs idő (javaslat: több figyelem az inkubátor karbantartása tekintetében, lejegyzendő az inkubáció kezdete) - hiba a mosásban vagy a fotométeres leolvasásban (javaslat: ellenőrizze a készülékek működéseit vagy beállításait - a Szubsztrát oldatok vagy a Konjugátum kontaminációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag tartókat használjon)
Alacsony reprodukálhatóságú eredmények	- a minták vagy reagensek nem konstans becseppentési térfogata (javaslat: ellenőrizze a pipetta-pontosságot, ellenőrizze a becseppentett térfogat és az assay által megkövetelt térfogat egyezőségét: recalibrálja a pipettát) - hiba a mosásban vagy a fotométeres leolvasásban (javaslat: ellenőrizze a készülékek működéseit vagy beállításait - a Szubsztrát oldatok kontaminációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag tartókat használjon) - a reagensek szennyeződése vagy degradálódása (javaslat: használjon megfelelő pipettacsúcsokat, egyszer használatos és tiszta műanyag tartókat reagensekhez és magas minőségű desztillált vagy azzal ekvivalens vizet)

HIBA	LEHETSÉGES OKOK/JAVASLATOK
nincs kolorimetrikus reakció szubsztrát hozzáadását követően	- néhány reagens nincs bepipettázva - Konjugátum vagy a Szubsztrát oldatok erős kontaminációja - hibák a teszt kivitelezésében (pl. reagentsek véletlenszerű pipettázása rossz sorrendben vagy rossz fiolából stb.)
túl alacsony reakció (túl alacsony ODs)	- inkubációs idő túl rövid, - inkubációs hőmérséklet túl alacsony - inkorrekkt konjugátum hígítás
túl magas reakció (túl magas ODs)	- inkorrekkt konjugátum hígítás - az inkubációs idő túl hosszú, inkubációs hőmérséklet túl magas - vízminőség a mosópufferhez elégtelen (alacsony szintű deionizáció) - elégtelen mosás (a konjugátumok nincsenek megfelelően eltávolítva)
megmagyarázhatatlan outliers	- a pipetták kontaminációja, hegyek és tartók - inkonstant és elégtelen mosás (konjugátumok nincsenek megfelelően eltávolítva)
túl magas belső CV%	- reagentsek és/vagy csikok nincsenek előmelegítve szobahőmérsékletre használat előtt - a plate mosó nem mos megfelelően (javaslat: tisztítsa meg a mosófejet)
túl magas külső CV%	- inkubációs kondíciók nem állandóak (idő, hőmérséklet) - a kontrollok és a minták nem ugyanabban az időben lettek pipettázva (azonos időközökkel) (ellenőrizze a pipettázási sorrendet) - személy-függő különbségek

### T. AUTOMATIZÁCIÓ

Ezen használati utasításban azonosított folyamat kézi tesztelésre vonatkozik. Automata készülékek használata esetén, kövesse az utasításokat, amelyek a a készülék gyártójának kézikönyvében vannak benne. A laboratóriumoknak követniük kell az ő validációs folyamataikat, hogy ezen termék kompatibilitását mutassák automatizált rendszereken.

### U. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

1. A pozitív eredményeket más hozzáférhető módszerrel kell konfirmálni és a beteg klinikai információival együtt kell interpretálni.
2. A betegség korai fázisában az antigének dektálhatalanok lehetnek. Ezáltal, az EIAGEN HBsAg Kit-tel kapott negatív eredmények csak arra utalnak, hogy a minta nem tartalmazza a hepatitis B felszíni antigén detektálható szintjét, és semelyik negatív eredményt nem szabad konklúzív evidenciának tekinteni abból a szempontból, hogy az egyén nem fertőzött HBV-vel vagy a véregység nem fertőzött HBV-vel.
3. Amennyiben az először reaktív minták újratesztelése során a teszt eredmények negatívak, ezen mintákat nem-ismételhetőnek (fals pozitív) kell értékelni. Sok nagyon szenzitív ELISA teszt esetén fals pozitív eredmények jelentkezhetnek több okból adódóan, azok legtöbbje kapcsolatos, bár nem kizárólagosan a nem megfelelő mosási lépésekkel. Több információhoz forduljon a "Problémamegoldás" (S fejezet) részhez vagy vegye fel a kapcsolatot az Adaltis technikai támogatójával további segítséghez.
4. A legáltalánosabb tesztelési hibák a következők: kiték használata a lejáratú időn túl, rossz mosási folyamatok, kontaminálódott reagensek, helytelen

tesztfolyamat lépések, elégtelen leszívás a mosás során, hiba a minták és a reagensek hozzáadásakor, a laboratóriumi készülék nem megfelelő működése, időbeli hibák, erősen hemolitikus vagy fibrintartalmú minták használata, nemteljesen alvadt szérum minták.

5. A marker prevalenciája befolyásolja a teszt prediktív értékét.
6. Ezt a tesztet nem lehet használni poolozott (kevert) plazma vizsgálatához. Az EIAGEN HBsAg Kit-et csak egyedi szérum vagy plazmamintákhoz fejlesztették.
7. Az EIAGEN HBsAg kít egy kvalitatív teszt és az eredményeket nem lehet antigén-koncentráció mérésére használni.
8. A REAGENS INSTABILITÁSI ROMLÁSÁNAK INDIKÁCIÓI
9. Pozitív és Negatív kontrollok értékei, amelyek az indikált minőségellenőrzési tartományon kívül esnek, a reagensek lehetséges elromlásának indikátorai és/vagy operátor vagy készülékhibák. Ezen esetekben az eredményeket érvénytelennek kell tekinteni és a mintákat újra kell tesztelni. Állandó hibás eredmények és a reagensek bizonyított elromlása vagy instabilitása esetén azonnal cserélje ki a reagenseket egy újra vagy vegye fel a kapcsolatot az Adaltis technikai támogatójával további segítséghez.

## **IRODALOM**

1. Stevens, C. E., P. E. Taylor, and M. J. Tong. 1988. Viral hepatitis and liver disease. Alan R. Riss, New York, N.Y. 142. Stevens, C. E., P. E. Taylor, M. J. Tong, P. T. Toy, G. N. Vyas, P. V. Nair.
2. J. Y. Weissman, and S. Krugman. 1987. Yeast-recombinant hepatitis B vaccine. Efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. JAMA 257:2612–2616. 143. Stevens, C. E., P. T. Toy, P. E. Taylor, T. Lee, and H. Y. Yip. 1992. Prospects for control of hepatitis B virus infection: implications of childhood vaccination and long term protection. Pediatrics 90(Suppl.):170–173.
3. Hurie, M. B., E. E. Mast, and J. P. Davis. 1992. Horizontal transmission of hepatitis B virus infection to U.S. born children of Hmong refugees. Pediatrics 89:269–273.
4. Szmuness, W., C. E. Stevens, E. J. Harley, E. A. Zang, W. R. Olesko, D. C. Williams, R. Sadovsky, J. M. Morrison, and A. Kellner. 1980. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled trial in a high risk population in the U.S. N. Engl. J. Med. 303:833–841.
5. Bhatnagar, P. K., E. Papas, H. E. Blum, D. R. Milich, D. Nitecki, M. J. Karels, and G. N. Vyas. 1982. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4400–4404.



---

# EIAgen

## HBsAg Kit

---

**REF** 071011

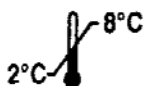
$\Sigma$  96

**REF** 071012

$\Sigma$  192

**REF** 071015

$\Sigma$  480



**IVD**



Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.

L'affidabilità dei risultati è garantita soltanto se le istruzioni vengono seguite attentamente.



**Fabbricante:**

**Adaltis S.r.l**

Via Durini, 27




















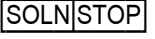

20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

[www.adaltis.net](http://www.adaltis.net)

**it**

**SIMBOLI UTILIZZATI NELLE ETICHETTE**

<b>Italiano</b> 								
	Dispositivo Medico Diagnostico in Vitro	Numero di Catalogo	Numero di Lotto	Attenzione, leggere le Istruzioni per l'uso	Limiti di Temperatura	Utilizzare Entro	Numero di Test	
								
	Fabbricante	Proteggere dalla Luce Solare	Data di Fabbricazione	Rischio Biologico	Micropiastra	Controllo Positivo	Controllo Negativo	
								
	Coniugato	Diluente del Saggio	Soluzione Substrato A (Perossido di Urea)	Soluzione Substrato B (TMB)	Soluzione Bloccante (0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Soluzione di Lavaggio Concentrato (20x)		



### A. FINALITA' D'USO

EIAgen HBsAg Kit è un saggio immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione qualitativa dell'HBsAg nel siero umano o plasma (EDTA, Citrato di Sodio o Eparina). Il kit può essere usato per lo screening di unità di sangue e per la diagnosi di pazienti infetti dal virus dell'epatite B.

Solo per uso diagnostico "in vitro".

### B. INTRODUZIONE

Il virus dell'Epatite B (HBV) è un virus racchiuso in un involucro che appartiene alle Hepadnaviridae, una famiglia di virus rivestiti con un genoma costituito da DNA a doppio filamento, e rappresenta la principale causa di trasmissione di patologie epatiche attraverso il sangue insieme al virus dell'epatite C (HCV). L'infezione da HBV è associata ad un ampio spettro di manifestazioni cliniche che variano da malattie di media entità a malattie inapparenti fino a epatite fulminante e gravi malattie croniche del fegato che in alcuni casi possono portare alla cirrosi e al cancro del fegato. La classificazione di un'infezione da epatite B richiede l'identificazione di diversi indicatori sierologici che si manifestano durante le tre fasi dell'infezione (incubazione, fase acuta e convalescenza). Attualmente vengono utilizzati diversi test diagnostici per lo screening, la diagnosi clinica e la gestione della malattia. L'antigene di superficie dell'Epatite B, anche conosciuto come antigene Australia, è la più importante proteina dell'involucro del Virus dell'Epatite B. L'antigene di superficie contiene il determinante "a", comune a tutti i sottotipi virali conosciuti, immunologicamente distinti tra due sottogruppi (ay e ad). L'HBV è suddiviso in 10 principali sierotipi e quattro sottotipi di HBsAg (adw, ady, ayw, e ayr). L'HBsAg può essere individuato entro 2-4 settimane prima che i livelli di ALT diventino anormali e entro 3-5 settimane prima dello svilupparsi dei sintomi. La determinazione sierologica dell'HBsAg è un valido metodo per la diagnosi e la prevenzione dell'infezione da HBV e il metodo ELISA è diventato il sistema analitico di maggior utilizzo per lo screening di donatori di sangue e per la diagnosi clinica di HBV in individui infetti.

### C. PRINCIPIO DEL TEST

EIAgen HBsAg Kit utilizza un principio ELISA di tipo "sandwich" in cui micropozzetti in polistirene sono pre-coattati con specifici anticorpi monoclonali anti-HBsAg. I campioni di siero o plasma vengono aggiunti ai micropozzetti. Durante l'incubazione, lo specifico immunocomplesso formatosi in caso di presenza di HBsAg nel campione, viene catturato nella fase solida. Successivamente, viene aggiunto nei pozzetti il secondo anticorpo coniugato con perossidasi di rafano (Coniugato-HRP) diretto contro un differente epitopo di HBsAg. Durante la seconda fase di incubazione, questi anticorpi coniugati-HRP si legheranno a qualsiasi complesso di anti-HBs-HBsAg formatosi precedentemente durante la prima incubazione e il coniugato-HRP slegato viene poi rimosso durante il lavaggio. Vengono aggiunti ai pozzetti soluzioni di Cromogeno contenenti tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di urea. In presenza di un immunocomplesso a "sandwich" anticorpo-antigene-anticorpo (HRP), i

Cromogeni incolori vengono idrolizzati tramite il legame con il coniugato-HRP ed il prodotto si colora di blu. Il colore blu diventa giallo dopo avere bloccato la reazione con acido solforico. L'intensità del colore può essere misurata ed è direttamente proporzionale alla quantità di antigene catturata all'interno dei pozzetti e ripettivamente alla quantità presente nel campione. I pozzetti che contengono campioni negativi all'HBsAg restano incolori.

### D. COMPONENTI

Il kit contiene i reagenti sufficienti per eseguire 96 tests (codice 071011), 192 tests (codice 071012), o 480 tests (codice 071015).

<b>Micropiastra</b>	1
<b>Controllo Negativo</b>	1 x 1.5 mL/flacone
<b>Controllo Positivo</b>	1 x 1.5 mL/flacone
<b>Coniugato</b>	1 x 6 mL/flacone
<b>Diluyente del Saggio</b>	1 x 5 mL/flacone
<b>Soluzione Substrato A (Perossido di Urea)</b>	1 x 6 mL/flacone
<b>Soluzione Substrato B (TMB)</b>	1 x 6 mL/flacone
<b>Soluzione Bloccante (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.5M)</b>	1 x 6 mL/flacone
<b>Soluzione di Lavaggio Conc. 20X</b>	1 x 30 mL/flacone
<b>Fogli Adesivi Copripiastra</b>	2
<b>Busta Minigrip</b>	1
<b>Numero di tests</b>	96
<b>Codice</b>	071011

<b>Micropiastra</b>	2
<b>Controllo Negativo</b>	1 x 1.5 mL/flacone
<b>Controllo Positivo</b>	1 x 1.5 mL/flacone
<b>Coniugato</b>	2 x 6 mL/flaconi
<b>Diluyente del Saggio</b>	2 x 5 mL/flaconi
<b>Soluzione Substrato A (Perossido di Urea)</b>	2 x 6 mL/flaconi
<b>Soluzione Substrato B (TMB)</b>	2 x 6 mL/flaconi
<b>Soluzione Bloccante (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.5M)</b>	2 x 6 mL/flaconi
<b>Soluzione di Lavaggio Conc. 20X</b>	2 x 30 mL/flaconi
<b>Fogli Adesivi Copripiastra</b>	3
<b>Busta Minigrip</b>	2
<b>Numero di tests</b>	192
<b>Codice</b>	071012

<b>Micropiastra</b>	5
<b>Controllo Negativo</b>	4 x 1.5 mL/flaconi
<b>Controllo Positivo</b>	4 x 1.5 mL/flaconi
<b>Coniugato</b>	5 x 6 mL/flaconi
<b>Diluyente del Saggio</b>	4 x 5 mL/flaconi
<b>Soluzione Substrato A (Perossido di Urea)</b>	5 x 6 mL/flaconi
<b>Soluzione Substrato B (TMB)</b>	1 x 30 mL/flaconi
<b>Soluzione Bloccante (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0.5M)</b>	3 x 50 mL/flaconi
<b>Soluzione di Lavaggio Conc. 20X</b>	6
<b>Fogli Adesivi Copripiastra</b>	6
<b>Busta Minigrip</b>	5
<b>Numero di tests</b>	480
<b>Codice</b>	071015

#### 1. Micropiastra

Micropozzetti vuoti fissati su un porta strip di plastica. 12 strips x 8 micropozzetti attivati con anticorpi monoclonali reattivi all'HBsAg (anti-HBs). Le piastre sono sigillate in una busta di alluminio contenente essiccante. Le strip sono scomponibili per poter utilizzare i micropozzetti individualmente. Posizionare i pozzetti o le strips inutilizzate nell'apposita busta di plastica

richiudibile contenente essiccante fornita con il kit e conservare a 2...8°C. Dopo la prima apertura rimane stabile per un mese a 2...8°C.

## 2. Controllo Negativo

Liquido di colore giallastro contenuto in un flacone con tappo a vite di colore neutro.

Tampone proteico stabilizzante testato come non reattivo all'HBsAg.

Pronto all'uso. Contiene conservante.

Una volta aperto è stabile per un mese a 2...8°C.

## 3. Controllo Positivo

Liquido di colore rosso contenuto in un flacone con tappo a vite rosso.

HBsAg diluito in un tampone proteico stabilizzante.

Pronto all'uso. Contiene conservante.

Una volta aperto è stabile per un mese a 2...8°C.

**Nota Importante:** *L'assenza di agenti patogeni vitali nel Controllo Positivo non può essere pienamente garantita, e quindi, il reagente deve essere trattato come potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio.*

## 4. Coniugato

Liquido di colore rosso contenuto in un flacone bianco con tappo a vite verde.

Contiene perossidasi di rafano coniugata a anticorpi anti-HBs.

Pronto all'uso. Contiene conservante.

Una volta aperto è stabile per un mese a 2...8°C.

## 5. Diluente del Saggio

Liquido di colore verde contenuto in un flacone con tappo a vite rosa.

Base sierica, caseina e soluzione di saccarosio.

Pronto all'uso. Contiene conservante.

Una volta aperto è stabile per un mese a 2...8°C.

## 6. Soluzione Substrato "A"

Liquido incolore contenuto in un flacone bianco con tappo a vite grigio.

Soluzione di perossido di urea.

Pronto all'uso.

Una volta aperto è stabile per un mese a 2...8°C.

## 7. Soluzione Substrato "B"

Liquido incolore contenuto in un flacone nero con tappo a vite nero.

TMB (soluzione di tetrametilbenzidina).

Pronto all'uso.

Una volta aperto è stabile per un mese a 2...8°C.

**Nota:** *Deve essere conservato al riparo dalla luce in quanto sensibile alla forte illuminazione.*

## 8. Soluzione Bloccante

Liquido incolore contenuto in un flacone bianco con tappo a vite rosso.

Soluzione diluita di acido solforico (0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Pronto all'uso.

Una volta aperto è stabile per un mese a 2...8°C.

**La MSDS è disponibile su richiesta dell'utilizzatore professionale**

## 9. Soluzione di Lavaggio Concentrata 20x

Liquido incolore contenuto in un flacone trasparente con tappo a vite di colore neutro. pH 7.4, 20 × PBS

La soluzione concentrata, prima dell'uso, deve essere diluita **1 a 20** con acqua distillata/deionizzata.

Una volta diluita, la soluzione rimane stabile una settimana a temperatura ambiente o per due settimane se conservata a 2...8°C.

## E. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (20, 50 e 100 µL) e puntali di plastica usa e getta.
2. Acqua di grado EIA (bidistillata o deionizzata, trattata con carbone per rimuovere gli agenti ossidanti chimici usati come disinfettanti).
3. Timer con intervallo di tempo di 60 min o più.
4. Fogli di carta assorbente.
5. Incubatore termostatico calibrato per micropiastre ELISA in grado di fornire una temperatura di +37°C ± 0.5°C.
6. Lettore calibrato di micropiastre ELISA con lettura a 450nm e possibilmente con filtri a 620-630nm per la determinazione del bianco.
7. Lavatore calibrato di micropiastre ELISA.
8. Vortex o similari strumenti per miscelare.

## F. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico specializzato e correttamente addestrato, sotto la supervisione del medico responsabile del laboratorio. Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima dell'utilizzo del prodotto.
2. Quando il kit è usato per lo screening di unità di sangue e componenti del sangue, deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale in quel campo (Ministero della Sanità o simili) per eseguire questo tipo di analisi.
3. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del saggio deve indossare abiti protettivi da laboratorio, guanti in lattice senza talco e occhiali. L'uso di ogni dispositivi appuntito (aghi) o tagliente (lame) dovrebbe essere evitato. Tutto il personale coinvolto dovrebbe essere addestrato sulle procedure di sicurezza personale, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie di Atlanta, US. e riportato nella pubblicazione dell'Istituto Nazionale di Sanità: "Sicurezza personale nei Laboratori Microbiologici e Biomedici", ed. 1984.
4. Tutto il personale coinvolto nel maneggiare i campioni dovrebbe essere vaccinato per HBV e HAV, per cui i vaccini sono disponibili sicuri ed efficaci.
5. L'ambiente di laboratorio dovrebbe essere controllato così da evitare contaminazioni da polvere e agenti microbiologici nell'aria, quando si aprono le fiale e la micropiastre del kit e quando viene eseguito il test. Proteggere la Soluzione Substrato "B" (TMB) dalla luce forte ed evitare vibrazioni del banco di lavoro una volta iniziato il test.
6. Dal ricevimento, conservare il kit a 2...8°C in un frigorifero o camera fredda a temperatura controllata.
7. Non scambiare i componenti tra differenti lotti del kit. E' raccomandato non scambiare i componenti di due kit dello stesso lotto.

8. Controllare che i reagenti siano limpidi e non contengano grosse particelle o aggregati. Se ciò accade allertare il supervisore del laboratorio per iniziare le necessarie procedure per la sostituzione del kit.
9. Evitare contaminazioni incrociate tra campioni di sieri/plasmi usando puntali monouso e cambiandoli dopo ogni campione.
10. Evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti del kit usando puntali monouso e cambiandoli per l'uso di ogni componente.
11. Non usare il kit dopo la data di scadenza impressa sulla confezione esterna e sull'etichetta di ogni singola fiala all'interno.
12. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infetti. Tutti i sieri umani dovrebbero essere maneggiati secondo il Livello 2 di BioSicurezza, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie, Atlanta, US. insieme con quanto riportato nella pubblicazione dell'Istituto di Sanità: "BioSicurezza nei laboratori Microbiologici e Biomedicali", ed. 1984. Per la preparazione del Controllo Negativo del kit possono essere stati usati materiali di origine umana. Questi materiali sono stati testati con kit dalle performance prestabilite e sono risultati negativi all'HIV 1/2, HCV, TP e all'HBsAg. Tuttavia, non esiste alcun metodo analitico in grado di assicurare che gli agenti infetti siano del tutto assenti nei campioni e nei reagenti. Quindi, maneggiare con estrema cautela i reagenti e i campioni, come se fossero in grado di trasmettere malattie infettive. Per stabilizzare il controllo positivo e negativo, sono stati utilizzati sieri di origine bovina. L'albumina di siero bovino (BSA) e il siero fetale bovino (FCS) derivano da animali provenienti da aree geografiche libere da BSE/TSE.
13. L'uso di contenitori di plastica monouso è raccomandato per la preparazione dei componenti liquidi o per i componenti trasferiti nelle postazioni automatizzate, questo per evitare contaminazioni incrociate.
14. I prodotti di scarto durante l'uso del kit devono essere scaricati secondo le direttive nazionali e le leggi riguardanti i rifiuti di sostanze chimiche e biologiche di laboratorio. In particolare, gli scarichi liquidi generati dalla procedura di lavaggio, da avanzi dei controlli e dai campioni devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti e inattivati prima di essere eliminati. Si suggerisce di inattivare per trattamento con una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per 16-18 ore o disattivazione a caldo in autoclave a 121°C per 20 minuti.
15. Rovesciamenti accidentali dei campioni durante le operazioni devono essere assorbiti con fogli di carta imbevuti di ipoclorito di sodio e poi sciacquati con acqua. I fogli di carta vanno poi gettati nell'apposito contenitore dei rifiuti per materiali biologici.
16. La Soluzione Bloccante contiene acido solforico allo 0.5M. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto sciacquare subito e abbondantemente con acqua.
17. ProClin™ 300 0.1% utilizzato come conservante, può causare irritazioni alla pelle. In caso di contatto con la pelle o con gli occhi sciacquare subito e abbondantemente con acqua.

18. Non fumare, non mangiare o applicare cosmetici nelle aree dove campioni e reagenti vengono maneggiati.
19. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (ad esempio: i puntali usati per controlli e campioni, micropiastre usate) dovrebbero essere maneggiate come potenzialmente infetti e riposti in accordo alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.
20. Non pipettare con la bocca.

## G. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

### 1. Raccolta Campioni:

- Non è necessaria alcuna preparazione speciale del paziente. Prelevare il campione in conformità con le buone pratiche di laboratorio. Con questo kit si possono usare campioni freschi di siero o plasma. Il sangue estratto tramite prelievo in vena deve coagularsi naturalmente e completamente - il siero/plasma deve essere separato prima possibile dal coagulo per evitare emolisi da RBC. Bisogna assicurarsi che i campioni di siero non siano contaminati da microrganismi. Qualsiasi anomalia visibile nel campione deve essere rimossa tramite centrifugazione a 3000 RPM (giri al minuto) per 20 minuti a temperatura ambiente o tramite filtrazione.
2. Si possono testare campioni di plasma preparati con EDTA, citrato di sodio o eparina, ma **non devono essere utilizzati campioni visibilmente iperlipemici o emolizzati** perchè potrebbero generare risultati falsi. **Non scaldare campioni inattivati.** Ciò potrebbe causare il deterioramento dell'analisi di riferimento. Campioni che presentano visibili contaminazioni microbiche non devono mai essere usati.
  3. EIAgen HBsAg Kit è stato ideato SOLO per testare campioni individuali di siero o plasma. Non utilizzare il kit per testare campioni di cadaveri, saliva, urina o di altri fluidi corporali o campioni di sangue mischiato o pool di campioni di sangue.
  4. **Trasporto e Conservazione:** Conservare i campioni a 2...8°C. I campioni che non devono essere utilizzati entro 7 giorni possono essere congelati (a -20°C oppure a temperature minori). Evitare cicli di congelamento e scongelamento. Per il trasporto, i campioni devono essere confezionati ed etichettati in conformità con le normative locali ed internazionali relative al trasporto di campioni clinici e agenti eziologici.

## H. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

I componenti del kit, se conservati ad una temperatura compresa tra 2...8°C, rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta e sulla confezione. I componenti non devono essere congelati. Per garantire una migliore performance dell'EIAgen HBsAg Kit, durante la conservazione proteggere i reagenti da contaminazioni con microrganismi o agenti chimici.

### 1. Micropiastre:

Permettere che la micropiastre raggiunga la temperatura ambiente (18...30°C), circa 1 ora, prima di aprire la busta. Le strips non utilizzate devono essere riposte

nell'apposita busta, in presenza dell'essiccante fornito, sigillate fermamente e conservate a 2...8°C. Dopo la prima apertura, le strips residue sono stabili per un mese se conservate a 2...8°C.

## 2. Controllo Negativo:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

## 3. Controllo Positivo:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Trattare questo componente come potenzialmente infetto.

## 4. Coniugato:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione a non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

## 5. Diluente del Saggio:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

## 6. Soluzione Substrato "A" e "B":

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione a non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Non esporre a forti fonti di luce, agenti ossidanti e superfici metalliche. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

## 7. Soluzione Bloccante:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

## 8. Soluzione di Lavaggio Concentrata 20x (vial of 30 mL):

L'intero contenuto della soluzione concentrata 20x deve essere diluito con acqua distillata/deionizzata fino a 600 mL (fino a 1000 mL per il flacone da 50 mL), il volume è riportato sull'etichetta, e deve essere miscelato delicatamente prima dell'uso. Poiché nel flacone potrebbero essere presenti dei cristalli, quando si prepara la soluzione prestare particolare attenzione nel far sciogliere completamente tutto il contenuto. Durante la preparazione evitare di generare schiuma perché la presenza di bolle può diminuire l'efficacia del lavaggio.

**Nota: Una volta diluita, la soluzione di lavaggio rimane stabile per 1 settimana a temperatura ambiente e per 2 settimane a 2...8°C.**

## I. STRUMENTAZIONE USATA IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le micropipette devono essere calibrate per rilasciare il corretto volume richiesto dal saggio e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcool denaturato, candeggina al 10%, soluzione disinfettante ospedaliera) di quelle parti che potrebbero accidentalmente entrare in contatto con il campione. Esse dovrebbero anche essere sottoposte ad una manutenzione periodica al fine di mostrare una precisione dell'1% e una correttezza di  $\pm 2\%$ . Deve essere effettuata regolarmente anche una decontaminazione dei componenti del kit da spruzzi o residui.

2. L'incubatore ELISA dovrebbe essere tarato a +37°C (tolleranza di  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ) e regolarmente controllato per assicurare il mantenimento della temperatura corretta. Sia incubatori a secco che bagni ad acqua sono utilizzabili per le incubazioni, se gli strumenti sono convalidati per l'incubazione di tests ELISA.

## 3. ISTRUZIONI PER IL LAVAGGIO

Il lavatore ELISA è estremamente importante per la totale riuscita del saggio:

- Una buona procedura di lavaggio è essenziale per ottenere dati analitici corretti e precisi.
- Quindi si raccomanda di usare un lavatore di micropiastre ELISA di buona qualità. Di solito sono sufficienti non meno di **5** cicli di lavaggio automatici da 350-400  $\mu\text{L}$ /pozzetto per evitare falsi positivi e fondi alti.
- Per evitare contaminazioni incrociate della piastra con il campione o con il coniugato-HRP, dopo l'incubazione, non buttare via il contenuto dei pozzetti ma consentire al lavatore della piastra di aspirarlo automaticamente.
- Assicurarsi che i canali del lavatore di micropiastre per la dispensazione del liquido non siano bloccati o contaminati e che ogni volta venga dispensato nei pozzetti un sufficiente volume di soluzione di Lavaggio.
- In caso di lavaggio manuale, suggeriamo di effettuare **5 cicli di lavaggio**, dispensando 350-400  $\mu\text{L}$ /pozzetto e aspirando il liquido per **5** volte. Se si osservano valori bassi (fondi alti), aumentare i cicli di lavaggio o l'intervallo di "soaking" per ciascun pozzetto.
- In ogni caso, il liquido aspirato dalle strips deve essere trattato con ipoclorito di sodio ad una concentrazione finale del 2.5% per 24 ore, prima di gettarle via nel modo appropriato.
- La soluzione di Lavaggio concentrata, prima del suo utilizzo, deve essere diluita **1:20**. Se viene utilizzata meno di una piastra intera, preparare un volume di soluzione proporzionato.

4. Il lettore di micropiastre ELISA deve essere dotato di un filtro di lettura di 450nm e idealmente di un secondo filtro (630nm) per le operazioni del bianco. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) ampiezza di banda  $\leq 10\text{nm}$ ; (b) intervallo di assorbimento da 0 a  $\geq 2.0$ ; (c) linearità  $\geq 2.0$ ; (d) ripetibilità  $\geq 1\%$ . Il bianco è determinato secondo le istruzioni contenute nella sezione "Procedura del Saggio". Il sistema ottico del lettore deve essere calibrato regolarmente per assicurare la corretta misurazione della densità ottica. La manutenzione dovrebbe essere fatta regolarmente secondo le istruzioni del produttore.

5. Quando si usa una stazione di lavoro automatizzata per kit ELISA, tutti i passaggi critici (dispensazione, incubazione, lavaggio, lettura, manipolazione dei dati) devono essere attentamente controllati, calibrati e regolarmente sistemati per ottenere corrispondenza con i valori riportati nella sezione O "Controllo di Qualità Interno". Il protocollo del saggio deve essere installato nel sistema operativo dell'unità e convalidato come per il lavatore e il lettore. Inoltre, la parte della stazione che manipola i componenti liquidi (dispensazione e lavaggio) deve essere convalidata e correttamente impostata.

Particolare attenzione va prestata nell'evitare il trascinarsi (carry-over) da parte degli aghi usati per la dispensazione e il lavaggio. Questo deve essere studiato e controllato per minimizzare la possibilità di contaminazione dai micropozzetti adiacenti. L'uso di stazioni di lavoro automatizzate ELISA è raccomandato per lo screening di sangue quando il numero dei campioni da testare è maggiore di 20-30 unità per run. Se si utilizza un'apparecchiatura totalmente automatica, non coprire le piastre con i copripiastre. Si può anche evitare di sbattere la piastra per rimuovere i residui presenti all'interno dopo il lavaggio.

#### L. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE SAGGIO

1. Controllare la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta esterna della scatola. Non usare il kit se è scaduto.
2. Controllare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili a occhio nudo. Controllare che le Soluzioni Substrato "A" e "B" siano incolori o blu pallido aspirando un piccolo volume dello stesso con una pipetta di plastica sterile trasparente. Controllare che nessuna rottura della confezione sia avvenuta nel trasporto e nessuna fuoriuscita di liquido sia presente all'interno della scatola. Controllare che la busta di alluminio, contenente la micropiastra, non sia bucata o danneggiata.
3. Diluire tutto il contenuto della Soluzione di Lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
4. Permettere a tutti i componenti del kit di raggiungere la temperatura ambiente (18...30°C), circa 1h, e poi miscelare come descritto.
5. Impostare l'incubatore ELISA a +37°C e preparare il lavatore ELISA avvinandolo con la soluzione di lavaggio diluita, secondo le istruzioni del produttore. Impostare il corretto numero di cicli di lavaggio come riportato nella sezione I.3.
6. Controllare che il lettore ELISA sia acceso da almeno 20 minuti prima della lettura.
7. Se si utilizza una stazione di lavoro automatizzata, accenderla, controllare le impostazioni e assicurarsi di usare il protocollo corretto.
8. Controllare che le micropipette siano impostate al volume richiesto.
9. Controllare che tutti gli strumenti siano disponibili e pronti all'uso.
10. In caso di problemi non procedere oltre con il test e informare il supervisore.

#### M. PROCEDURA DEL SAGGIO

Il saggio deve essere eseguito secondo quanto riportato di seguito, prestando attenzione a mantenere lo stesso tempo di incubazione per tutti i campioni da testare.

#### SAGGIO MANUALE:

1. **Preparazione:** Impiegare tre pozzetti per il Controllo Negativo (es. B1, C1, D1), due pozzetti per il Controllo Positivo (es. E1, F1) e uno per le operazioni del Bianco (es. A1, nè i campioni nè il Coniugato si devono aggiungere al pozzetto per le operazioni del Bianco). Nel caso in cui si utilizzi un lettore di micropiastra a doppia lunghezza d'onda per la determinazione dei risultati, si può omettere

l'utilizzo del pozzetto per le operazioni del Bianco. Utilizzare solo il numero di strips richieste per il test.

2. **Aggiunta del Diluente:** Aggiungere 20µL di Diluente del Saggio in ciascun pozzetto tranne quello per le operazioni del Bianco.
3. **Aggiunta del Campione:** Aggiungere 100µL di Controllo Positivo, Controllo Negativo e Campione nelle loro rispettive celle tranne quella per le operazioni del Bianco. **Nota: Utilizzare un puntale monouso separato per ciascun campione, Controllo Negativo, Controllo Positivo per evitare contaminazioni incrociate. Miscelare sbattendo delicatamente la piastra.**
4. **Incubazione:** Coprire la piastra con il copripiastra e incubare per 60 minuti a 37°C.
5. **Aggiunta del Coniugato:** Alla fine dell'incubazione, rimuovere e gettare via il copripiastra. Aggiungere 50µL di Coniugato in ciascun pozzetto tranne quello per le operazioni del Bianco, e miscelare sbattendo delicatamente la piastra.
6. **Incubazione:** Coprire la piastra con il copripiastra e incubare per 30 minuti a 37°C.
7. **Lavaggio:** Alla fine dell'incubazione, rimuovere e gettare via il copripiastra. Lavare ciascun pozzetto per 5 volte con Soluzione di Lavaggio diluita. Ogni volta immergere i micropozzetti per 30-60 secondi. Dopo il ciclo di lavaggio finale, girare la piastra verso il basso su carta assorbente o su un panno pulito e sbatterla per rimuovere qualsiasi residuo (vedi sezione I.3).
8. **Colorazione:** Aggiungere 50µL di Soluzione Substrato "A" e 50µL di Soluzione Substrato "B" in ogni pozzetto compreso quello per le operazioni del Bianco. Incubare la piastra a 37°C per 30 minuti **evitando la luce**. La reazione enzimatica tra le Soluzioni Substrato ed il Coniugato genera un colore blu nel Controllo Positivo e nei pozzetti contenenti campioni positivi all'HBsAg.
9. **Reazione Bloccante:** Usando una pipetta multicanale o manuale, aggiungere 50µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto e miscelare delicatamente. Si svilupperà un giallo intenso nel Controllo Positivo e nei pozzetti contenenti campioni positivi all'HBsAg.
10. **Misurazione dell'Assorbanza:** Calibrare il lettore di piastre con il pozzetto per le operazioni del Bianco e leggere l'assorbanza a 450nm. Se viene utilizzato uno strumento a doppio filtro, impostare la lunghezza d'onda di riferimento a 630nm. Calcolare il valore del Cut-off e valutare i risultati. (**Nota:** leggere i valori di assorbanza entro 10 minuti dalla fine della reazione).

#### Note importanti:

1. Se il secondo filtro non è disponibile assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo della micropiastra prima della lettura a 450nm. Tali impronte potrebbero generare falsi positivi.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 10 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire una leggera auto-ossidazione del substrato e portare ad un risultato di fondo alto.

## N. SCHEMA DEL SAGGIO

Step	Operazioni
Diluyente del Saggio	20 µL
Controlli e Campioni	100 µL
<b>1<sup>a</sup> incubazione</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Coniugato	50 µL
<b>2<sup>a</sup> incubazione</b>	<b>30 min</b>
Temperatura	+37°C
Lavaggio	5 cicli (vedi sezione I.3)
Substrato "A"	50 µL
Substrato "B"	50 µL
<b>3<sup>a</sup> incubazione</b>	<b>30 min (evitando la luce)</b>
Temperatura	+37°C
Soluzione Bloccante	50 µL
Letture OD	450/630nm

Un esempio di schema di dispensazione è riportato di seguito (valido per le procedure di entrambi i tempi di incubazione):

		Micropiastra											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3											
B	NC	S4											
C	NC	S5											
D	NC	S6											
E	PC	S7											
F	PC	S8											
G	S1	S9											
H	S2	S10											

Legenda: BLK = Bianco NC = Controllo Negativo  
PC = Controllo Positivo S = Campione

## O. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

I risultati del test sono validi se sono soddisfatti i criteri del Controllo di Qualità. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca un appropriato sistema di controllo di qualità con materiale di controllo di qualità simile o identico al campione del paziente che si sta analizzando.

- Il valore A del pozzetto per le operazioni del Bianco, che contiene solo Cromogeno e Soluzione Bloccante è < 0.080 at 450 nm.
- I valori A del Controllo Positivo Control devono essere ≥ 0.800 a 450/630nm oppure a 450nm dopo le operazioni del bianco.
- I valori A del Controllo Negativo devono essere < 0.100 a 450/630nm oppure a 450nm dopo le operazioni del bianco.

Se uno dei valori A del Controllo Negativo non soddisfa i criteri del Controllo di Qualità, deve essere eliminato e deve essere calcolato di nuovo il valore medio utilizzando i due valori rimanenti. Se più di un valore A del Controllo Negativo non soddisfa le specifiche del Controllo di Qualità, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti stabiliti sopra, procedere alla prossima sezione.

Se così non fosse, non procedere ulteriormente ed eseguire i seguenti controlli:

Problemi	Controllo
<b>Bianco</b> ≥ 0.080 OD450nm	1. che le Soluzioni Substrato non siano state contaminate durante il saggio
<b>Controllo Negativo (NC)</b> ≥ 0.100 OD450/630nm o 450nm dopo sottrazione del bianco	1. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 2. che sia stata usata la corretta soluzione di lavaggio e che il lavatore sia stato avvinato prima dell'uso; 3. che nessun errore sia stato commesso nella procedura del saggio (dispensazione del controllo positivo invece del negativo); 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione del controllo negativo o delle sue celle a causa di schizzi dei campioni positivi o del coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non siano contaminate con campioni positivi o con il coniugato; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
<b>Controllo Positivo</b> < 0.800 OD450/630nm o 450nm dopo sottrazione del bianco	1. che le procedure siano state eseguite correttamente; 2. che nessun errore sia stato commesso nella distribuzione del controllo (dispensazione del controllo negativo al posto del positivo); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione esterna del controllo positivo.

*Se si è verificato qualcuno dei problemi riportati sopra, informare il supervisore per ulteriori azioni.*

## P. RISULTATI

Ogni micropiastra deve essere considerata separatamente nel calcolo e nell'interpretazione dei risultati del test, indipendentemente dal numero di piastre utilizzate simultaneamente. I risultati sono calcolati rapportando il valore di assorbanza (A) di ogni campione con il valore di Cut-Off (CO) della piastra. Se la lettura del Cut-Off viene eseguita su un lettore di micropiastra con filtro singolo, i risultati devono essere calcolati sottraendo il valore A del pozzetto per le operazioni del Bianco dai valori dei campioni e dei controlli riportati nell'analisi. Se la lettura viene eseguita con un lettore di micropiastra a filtro doppio non bisogna sottrarre il valore A del pozzetto per le operazioni del Bianco dalla stampa del report dei valori dei campioni e dei controlli.

$$\text{Cut-Off (C.O.)} = \text{NC medio} + 0.06$$

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

Un esempio di calcolo è riportato di seguito:

**Esempio:**

**1. Controllo di Qualità**

Valore A del pozzetto per le operazioni di Bianco: A1= 0.025 a 450nm (Nota: la sottrazione del bianco è richiesta solo quando la lettura viene eseguita con un lettore con filtro singolo a 450nm)

Pozzetto No.:	B1	C1	D1
Valori A del controllo Negativo dopo l'estrazione del bianco:	0.020	0.012	0.016

Pozzetto No.:	E1	F1
Valori A del controllo Positivo dopo l'estrazione del bianco:	2.421	2.369

Tutti i valori di controllo rientrano nei range prefissati del controllo di qualità.

**2. Calcolo del Nc:**  $= \frac{(0.020+0.012+0.016)}{3} = 0.016$

**3. Calcolo del Cut-off:** (C.O.) =  $0.016 + 0.06 = 0.076$

**Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

**Risultati Negativi (A / C.O. < 0.9):**

I campioni che presentano un'assorbanza inferiore al valore del Cut-off sono negativi, ciò indica che tramite l'EIAgen HBsAg Kit non è stato rilevato l'antigene di superficie del virus dell'epatite B, quindi il paziente probabilmente non è stato infettato da HBV e l'unità di sangue non contiene l'antigene di superficie del virus dell'epatite B e può essere trasfusa solo nel caso in cui siano assenti anche marcatori di altre malattie infettive.

**Risultati Positivi (A / C.O. > 1.1):**

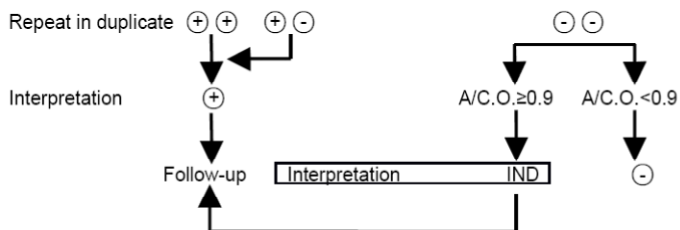
I campioni che presentano un'assorbanza uguale o maggiore del valore del Cut-off sono da considerarsi inizialmente reattivi, ciò indica che tramite l'EIAgen HBsAg Kit è stato rilevato l'antigene di superficie del virus dell'epatite B. Tutti i campioni inizialmente reattivi devono essere testati nuovamente in duplicato usando l'EIAgen HBsAg Kit prima dell'interpretazione finale dei risultati del saggio. I campioni ripetutamente reattivi con l'EIAgen HBsAg Kit possono essere considerati positivi all'antigene di superficie del virus dell'epatite B.

**Equivoci (A / C.O. = 0.9-1.1):**

I campioni che presentano un indice di Cut-off compreso tra 0.9 e 1.1 sono da considerarsi come equivoci e bisogna testarli nuovamente in duplicato al fine di confermare i risultati iniziali.

**Sono necessari ulteriori controlli, conferme e prove supplementari, di ogni campione positivo con altri sistemi di analisi (es. PCR). La diagnosi clinica non dovrebbe essere stabilita sulla base di un singolo test. Dovrebbe integrare dati e risultati clinici e altri dati di laboratorio.**

**INITIAL RESULTS INTERPRETATION AND FOLLOW-UP ALL INITIALLY REACTIVE OR BORDERLINE SAMPLES**



IND = indeterminabile

Se, in seguito ad un ulteriore test dei campioni inizialmente reattivi, entrambi i pozzetti risultano negativi (A/C.O.<0,9), questi campioni dovrebbero essere considerati come positivi non ripetibili (o falsi positivi) e devono essere registrati come negativi. Come per molti test ELISA molto sensibili, per vari motivi, possono verificarsi risultati falsi positivi, la maggior parte dei quali sono dovuti, ma non solo, alla fase di lavaggio inadeguata. Per ulteriori informazioni consultare la "Guida alla Risoluzione dei Problemi" (sezione S).

Se, in seguito ad un ulteriore test in duplicato, uno o entrambi i pozzetti risultano positivi, il risultato finale effettuato con questo test ELISA deve essere registrato come ripetutamente reattivo. Campioni ripetutamente reattivi si possono considerare positivi all'antigene di superficie del virus dell'epatite B e quindi il paziente è probabilmente infetto da HBV e l'unità di sangue deve essere scartata.

Dopo un ulteriore test in duplicato, i campioni con valori vicini al valore del Cut-off devono essere interpretati con cautela e considerate come campioni "equivoci", o non determinabili al tempo del test.

**Note importanti:**

1. L'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio.
2. Quando i risultati sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione per non trasferire dati errati.
3. La diagnosi di infezione da epatite virale deve essere fatta e comunicata al paziente solo da personale medico qualificato.

**R. PRESTAZIONI**

La Valutazione delle Prestazioni è stata condotta in accordo a quanto riportato in Common Technical Specifications o CTS (art. 5, Capitolo 3 di IVD Direttiva 98/79/EC).

Studi di valutazione condotti presso Paul-Ehrlich-Institut (PEI), German Red Cross Institute Baden-Württemberg – Hessen ed in tre banche del sangue, hanno dimostrato le seguenti performance dell'EIAgen HBsAg Kit.

**1. SPECIFICITA'**

Quando sono stati testati donatori di sangue Europei (n=5038), è stata trovata una specificità diagnostica del 99.78%.

Durante una valutazione condotta in diversi centri (Sito A, B e C), l'EIAgen HBsAg Kit ha dimostrato una specificità del 99.92%.



Laboratorio	Numero	EIAgen HBsAg Kit		
		-	+	Specificità
Banca del sangue "A"	1958	1955	3	99.85%
Banca del sangue "B"	2518	2516	2	99.92%
Banca del sangue "C"	6344	6340	4	99.94%
Totale	10820	10811	9	99.92%

## 2. SENSIBILITA'

La sensibilità dell'EIAgen HBsAg Kit è stata testata su 22 pannelli commerciali di sieroconversione di HBV e su un totale di 403 campioni positivi all'HBsAg inclusi 146 campioni di plasma genotipi HBsAg HBV e sottotipi HBsAg disponibili presso il Paul-Ehrlich-Institut. In riferimento alla sensibilità di sieroconversione, i risultati per l'EIAgen HBsAg Kit su 22 pannelli di sieroconversione di HBV hanno dimostrato un livello di sensibilità almeno equivalente alla gamma di test marcati CE per lo screening dell'HBsAg per i quali il PEI conserva i dati. Sono stati testati in casa 10 pannelli di sieroconversione supplementari. La sensibilità di sieroconversione è risultata paragonabile ad altri test marcati CE per lo screening dell'HBsAg. Per quanto riguarda la sensibilità diagnostica l'EIAgen HBsAg Kit ha rilevato tutti i campioni positivi come positivi, tra cui i genotipi HBV A-F o i sottotipi HBsAg esaminati.

In conclusione, il punteggio totale dell'EIAgen HBsAg Kit per la sensibilità di sieroconversione è risultato comparabile ad altri kit HBsAg marcati CE per i quali il PEI conserva i dati e tutti i 403 campioni positivi all'HBsAg sono risultati reattivi mostrando una sensibilità totale pari al 100%.

## 3. SENSIBILITA' ANALITICA

0.1 IU/mL (NIBSC 001588)

## 4. SPECIFICITA' ANALITICA

Non è stata osservata alcuna interferenza con campioni provenienti da pazienti con livelli alti di fattore reumatoide e da donne incinte. Nello stesso giorno sono stati testati campioni congelati per verificare le interferenze dovute alla raccolta ed alla conservazione. Sono stati testati per l'HBsAg, con l'EIAgen HBsAg Kit, un totale di 100 campioni reattivi all'anti-HBc, all'anti-HCV e all'anti-HIV-1. 98 campioni su 100 sono risultati negativi all'HBsAg. Sono stati testati con l'EIAgen HBsAg Kit anche 200 campioni di sangue. 191 campioni su 200 sono risultati negativi all'HBsAg. 8 campioni su 9 con risultati di screening inizialmente reattivi, una volta testati con l'EIAgen HBsAg Kit, sono risultati di nuovo reattivi, ma in nessun caso è stato confermato il virus dell'epatite B.

## 5. RICERCA DELLE MUTAZIONI

E' stato testato un pannello di 108 campioni elaborato dal PCR per dimostrare le performance dell'EIAgen HBsAg Kit nella ricerca delle mutazioni dell'HBsAg. I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Background	Numero	EIAgen HBsAg Kit
adr (+)	"wild type" 35 4 mutazioni 5	33 4
adw (+)	"wild type" 37 16 mutazioni 25	34 24
ayw (+)	"wild type" 2 2 mutazioni 2	2 2
ayr (+)	2 mutazioni 2	2
Totale	108	101

## 6. RIPRODUCIBILITA'

Tipo di Campione	Riproducibilità		Inter Saggio		Intra Saggio	
	n	OD Media	CV%	OD Media	CV%	
0.1IU/mL HBsAg	10	0.155	10.6%	0.150	11.0%	
Positivo Debole	10	0.457	9.0%	0.432	9.5%	
Positivo Moderato	10	1.572	7.0%	1.437	7.5%	
Positivo Forte	10	2.327	4.2%	2.302	4.4%	
Controllo Positivo	10	2.322	4.1%	2.315	4.2%	

## S. SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Seguire scrupolosamente la procedura e le specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione, possono evitare i seguenti tipi di errore:

ERRORE	POSSIBILI CAUSE / SUGGERIMENTI
OD molto diverse ( $\pm 50\%$ ) da quelle riportate nel QC	-errato volume di dispensazione dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente) -errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare l'inizio dell'incubazione) -errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato o del Coniugato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti)
Risultati poco riproducibili	-volume di dispensazione dei reagenti e dei campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio; tarare nuovamente le pipette) -errore nell'esecuzione dei lavaggi o della lettura (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti) -inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimento: utilizzare puntali appropriati, contenitori di plastica monouso puliti e acqua distillata di alta qualità o equivalente)
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta delle Soluzioni Substrato	-alcuni reagenti non sono stati dispensati -forte contaminazione del Coniugato o delle Soluzioni Substrato -errata esecuzione della procedura del saggio (es. dispensazione accidentale dei reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato, ecc.)



Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	-tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppo bassa -errata diluizione del coniugato
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	-errata diluizione del coniugato -tempo di incubazione troppo lungo, temperature di incubazione troppo alta -qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione) -lavaggio non sufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
Inspiegabili risultati	-contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori -lavaggio incostante e insufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
CV% intersaggio elevato	-reagenti e/o strip non portate a temperature ambiente prima dell'uso - il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)
CV% intrasaggio elevato	-condizioni di incubazione non costanti (tempo, temperatura) -controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli) (controllare l'ordine di dispensazione) -variabilità intrinseca degli operatori

## T. AUTOMAZIONE

La procedura descritta in questa istruzione per l'uso è solo per il test in manuale. Quando si utilizzano degli analizzatori automatici, bisogna seguire le istruzioni che sono descritte nei manuali d'uso del dispositivo stesso. Ogni laboratorio deve seguire i propri processi di validazione interna dimostrando la compatibilità con i sistemi automatici.

## U. LIMITAZIONI

1. I risultati positivi devono essere confermati con un altro metodo disponibile e interpretati in combinazione con le informazioni cliniche del paziente.
2. Gli antigeni possono essere rilevati durante la fase iniziale della malattia. Pertanto, i risultati negativi ottenuti con l'EIAgen HBsAg Kit indicano solo che il campione non contiene un livello rilevabile dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B e qualsiasi risultato negativo non deve essere considerato come la prova definitiva che l'individuo o l'unità di sangue non sono infettati da HBV.
3. Se, dopo avere testato nuovamente i campioni inizialmente reattivi, i risultati del test sono negativi, questi campioni possono essere considerati come non-ripetibili (falsi positivi) e interpretati come negativi. Come per molti test ELISA molto sensibili, per vari motivi, possono verificarsi risultati falsi positivi, la maggior parte dei quali sono dovuti, ma non solo, alla fase di lavaggio inadeguata. Per ulteriori informazioni consultare la "Guida alla Risoluzione dei Problemi" o contattare l'assistenza tecnica Adaltis per un ulteriore supporto.
4. Gli errori di analisi più comuni sono: l'utilizzo del kit oltre la data di scadenza, errate procedure di lavaggio, reagenti contaminati, errati passaggi della procedura del test, aspirazione insufficiente durante il lavaggio, la mancata aggiungere di campioni o reagenti, utilizzo improprio delle attrezzature di

laboratorio, errori di tempistica, uso di campioni fortemente emolizzati o campioni contenenti fibrina, campioni di siero non completamente coagulato.

5. La prevalenza del marcatore influenzerà i valori predittivi del test.
6. Questo test non può essere utilizzato per testare plasma mischiato o pool di campioni di plasma. EIAgen HBsAg Kit è stato ideato solo per testare campioni individuali di siero o plasma.
7. EIAgen HBsAg Kit è un saggio qualitativo ed i risultati non possono essere utilizzati per misurare la concentrazione dell'antigene.
8. **INDICAZIONI DI INSTABILITÀ E DETERIORAZIONE DEL REAGENTE:**

I valori dei controlli Positivi e Negativi, che sono fuori dal range del controllo di qualità indicato, sono indicatori di possibile deterioramento dei reagenti e/o errori operativi o dovuti alle attrezzature. In tal caso, i risultati dovrebbero essere considerati non validi ed i campioni devono essere testati nuovamente. In caso di risultati errati costanti e comprovato deterioramento o instabilità dei reagenti, sostituire immediatamente i reagenti con altri nuovi o contattare l'assistenza tecnica Adaltis per un ulteriore supporto.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Stevens, C. E., P. E. Taylor, and M. J. Tong. 1988. Viral hepatitis and liver disease. Alan R. Riss, New York, N.Y. 142. Stevens, C. E., P. E. Taylor, M. J. Tong, P. T. Toy, G. N. Vyas, P. V. Nair.
2. J. Y. Weissman, and S. Krugman. 1987. Yeast-recombinant hepatitis B vaccine. Efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. *JAMA* 257:2612–2616. 143. Stevens, C. E., P. T. Toy, P. E. Taylor, T. Lee, and H. Y. Yip. 1992. Prospects for control of hepatitis B virus infection: implications of childhood vaccination and long term protection. *Pediatrics* 90(Suppl.):170–173.
3. Hurie, M. B., E. E. Mast, and J. P. Davis. 1992. Horizontal transmission of hepatitis B virus infection to U.S. born children of Hmong refugees. *Pediatrics* 89:269–273.
4. Szmuness, W., C. E. Stevens, E. J. Harley, E. A. Zang, W. R. Olesko, D. C. Williams, R. Sadovsky, J. M. Morrison, and A. Kellner. 1980. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled trial in a high risk population in the U.S. *N. Engl. J. Med.* 303:833–841.
5. Bhatnagar, P. K., E. Papas, H. E. Blum, D. R. Milich, D. Nitecki, M. J. Karels, and G. N. Vyas. 1982. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4400–4404.