



CE
0344

HBeAg/Anti-HBe Elisa

KAPG4BNE3

History

Resume of change :

Previous Version :	Current Version :
170224/1	191024/1
/	Addition of Manufacturer symbol
/	Addition of IVD symbol
/	Addition of CLP hazard symbols
/	Addition of Residual Risk
4.1) Storage Condition and Stability of the kit Concentrated Washing Solution (20x): 2-8°C Stop solution: 2-8°C	4.1) Storage Condition and Stability of the kit Concentrated Washing Solution (20x): Room temp Stop solution: Room Temp
P.I. Number : 1701153	P.I. Number cleared
No history	History added




HBeAg/Anti-HBe Elisa

For in-vitro detection of HBeAg and Anti-HBe in human serum or plasma

en

KAPG4BNE3

IN VITRO DIAGNOSTIC USE 

 DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium
Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

1) INTENDED USE

HBeAg / ANTI-HBe ELISA is an enzyme immunoassay diagnostic kit, for in vitro qualitative testing of HBeAg and Anti-HBe in human serum or plasma.

2) SUMMARY AND TEST EXPLANATION

2.1) For HBeAg detection

For HBeAg detection, HBeAg / ANTI-HBe ELISA adopts the "sandwich principle" (Antibody Antigen Antibody) as the basis of the assay. When Anti-HBe coated wells and Anti-HBe HRPO conjugate are incubated with specimens containing HBeAg, (antibody)-(antigen) - (antibody HRPO) complexes are formed on the wells. After washing to remove unbound materials, TMB substrate is added and color develops in proportion to the amount of HBeAg bound. The color development is stopped by adding stop solution. The Optical Density of developed color is read with a suitable spectrophotometer against 450 nm/620-690 nm*.

The above description is shown in the following figure.

A Specimen containing HBeAg:

1. (Plate well)-(Anti-HBe) + Specimen (HBeAg) + Anti-HBe-HRPO
→ (plate well)-Anti-HBe-HBeAg-(Anti-HBe-HRPO) sandwich complex
2. Sandwich complex + TMB substrate solution → Light blue to blue color
3. Add stop solution to stop the color development → Read OD at 450 nm/620-690 nm*

B Specimen without HBeAg:

1. (Plate well)-(Anti-HBe) + Specimen (no HBeAg) + Anti-HBe-HRPO → (plate well)-Anti-HBe
2. (plate well)-Anti-HBe + TMB substrate solution → Colorless to light blue color
3. Add stop solution to stop the color development → Read OD at 450 nm/620-690 nm*

2.2) For Anti-HBe detection

For Anti-HBe detection, HBeAg / ANTI-HBe ELISA adopts the "Neutralization Principle".

When specimen is incubated with Neutralizing Solution for Anti-HBe in the well(s) coated with Anti-HBe, The HBeAg from the Neutralizing Solution for Anti-HBe will be neutralized by Anti-HBe in the specimen. The more the concentration of Anti-HBe, the less the concentration of remaining HBeAg, and finally the lower the Optical Density developed. The above description is shown in the following figure.

A Specimen containing Anti-HBe:

1. (plate well)-Anti-HBe + Specimen (Anti-HBe) + Neutralizing Solution (HBeAg)
→ (Plate well)-Anti-HBe-HBeAg and HBeAg-Anti-HBe
After washing, only (Plate well)-Anti-HBe-HBeAg remains on the plate well(s).
2. (Plate well)-Anti-HBe HBeAg + Anti-HBe-HRPO
→ (Plate well)-Anti-HBe-HBeAg (Anti-HBe-HRPO) sandwich complex
3. Sandwich complex + TMB substrate solution
→ Light blue to colorless

4. Add stop solution to stop the color development

→Read OD at 450 nm/620-690 nm*.

B Specimen without Anti-HBe:

1. Plate well (Anti-HBe) + Specimen (without Anti-HBe) + Neutralizing Solution (HBeAg)

→ (Plate well)-Anti-HBe-HBeAg

2. (Plate well)-Anti-HBe-HBeAg + Anti-HBe-HRPO → (Plate well) - Anti-HBe • HBeAg - (Anti-HBe-HRPO) sandwich complex

3. Sandwich complex + TMB substrate solution → blue color

4. Add stop solution to stop the color development →Read OD at 450 nm/620-690 nm*.


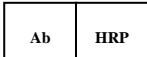
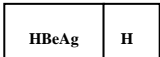
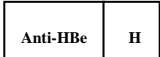

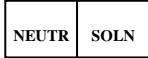
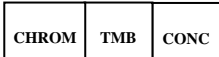
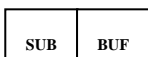
3) BRIEF DESCRIPTION OF THE PRODUCT

The solid phase of HBeAg / ANTI-HBe ELISA is made of polystyrene wells coated with Anti-HBe; Anti-HBe is used to prepare the Anti-HBe peroxidase (horseradish) conjugate in the liquid-phase. In HBeAg detection, specimens, which are non-reactive by HBeAg / ANTI-HBe ELISA are considered negative for HBeAg. Specimens with absorbance values LESS than 0.9 X Cutoff Value are considered NON-REACTIVE for HBeAg by the criteria of HBeAg / ANTI-HBe ELISA. Specimen with absorbance values GREATER than 1.1 X Cutoff Value is considered REACTIVE for HBeAg. Specimen with absorbance values within the Retest Range (Cut off Value ± 10%) , the test must be repeated in duplicate and interpreted as above.

In Anti-HBe detection, specimens, which are non-reactive by HBeAg / ANTI-HBe ELISA are considered negative for Anti-HBe. Specimens with absorbance values greater than 1.1 X Cutoff Value are considered NON-REACTIVE for Anti-HBe by the criteria of HBeAg / ANTI-HBe ELISA. Specimen with absorbance values less than 0.9 X Cutoff Value is considered REACTIVE for Anti-HBe. Specimen with absorbance values within the Retest Range (Cut off Value ± 10%) , the test must be repeated in duplicate and interpreted as above.

4) DESCRIPTION OF MATERIALS PROVIDED

•Item 1 - 8 on the following reagent table should be refrigerated at +2 to +8°C . Washing Solution D (20x) and stop solution can be stored at +2 to +30°C.

ITEMS	Components	Descriptiuon	Qt. per 96 tests
(1)	Anti-HBe Plate 	One microtiter plate coated with antibody to HBeAg (Anti-HBe) .	1 plate
(2)	Anti-HBe Peroxidase Solution 	Containing anti-HBe • Peroxidase (horseradish) conjugate dissolved in protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1bottle, 11 ml
(3)	HBeAg Positive Control 	Containing HBeAg positive serum diluted in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 1.5 ml
(4)	Anti-HBe Positive Control 	Containing Anti-HBe positive serum dissolved in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 1.5 ml
(5)	HB Negative Control 	Containing normal human serum, which is free of HBeAg, Anti-HBe and HBsAg. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 2 ml
(6)	Neutralizing Solution for Anti-HBe 	Containing HBeAg positive serum diluted in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 7 ml
(7)	Chromogenic TMB concentrate 	0.6 mg/ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base.	1 bottle, 12 ml
(8)	Substrate buffer 	Citrate Acid Buffer containing 0.03% H ₂ O ₂ .	1 bottle, 12 ml

(9)	Conc. Washing Solution (20X) <table border="1" style="margin-left: 20px;"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC	Concentrated Phosphate buffer with tween-20	1 bottle, 58 ml
WASH	SOLN	CONC				
(10)	Stop Solution <table border="1" style="margin-left: 20px;"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN	2N H ₂ SO ₄	1 bottle, 12 ml	
STOP	SOLN					

• OTHER MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

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

4.1) Storage Condition and Stability of the kit *

Kit/components	Storage condition	State	Stability
HBeAg / ANTI-HBe ELISA KIT	+2 to +8°C	Original	10 months
		Once open	1 month
HBeAg Positive Control	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HBe Positive Control	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
HB Negative Control	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HBe Plate	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HBe Peroxidase Solution	+2 to +8°C	Original	10 months
		Once open	1 month
Neutralizing Solution for Anti-HBe	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
Concentrated Washing Solution (20X)	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month
20X Diluted Washing Solution	Room temp.	Diluted	2 days
	+2 to +8°C	Diluted	1 week
Chromogenic TMB concentrate	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
Substrate buffer	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
Stop Solution	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month

5) INSTRUCTION FOR USE

5.1) Warning:

5.1.1) This reagent kit is for professional use only.

5.1.2) **IVD** This reagent kit is for *in vitro* diagnostic use only.

5.1.3) Bring all kit reagents and samples to room temperature (+20 to +30°) and mix carefully before use.

5.1.4) Do not use reagent beyond its expiration date.

5.1.5) Do not interchange reagents between different lots.

5.1.6) Do not put the pipette in your mouth.

5.1.7) Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.

5.1.8) The positive control, negative control, conjugate solution and specimens should be regarded as potential health hazards. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures may include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols.


5.1.9) Potential infectious specimens and nonacid containing spills or leakages should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite or treated in accordance with the local procedures for potential bio-hazard control.



5.1.10) Prior to disposing used specimens and kit reagents as general waste, it should be treated in accordance with the local procedures for potential bio-hazardous waste or treated as follows:

Both liquid and solid waste should be autoclaved maintaining +121°C for at least 30 minutes.

Solid waste can also be incinerated. Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%.

Acidic liquid wastes must be neutralized before treatment with sodium hypochlorite as mentioned above and should stand for 30 minutes to obtain effective disinfection.

5.1.11)  Stop solution is an irritant to skin, eyes, respiratory tract and mucous membranes. Avoid contact of the stop solution with skin and mucous membranes. In case of contact, clean with large lots of water immediately. In case of inhalation, supply fresh air and seek medical advice in case of complaints.

5.1.12)   Chromogenic TMB concentrate contains organic solvent which is toxic: danger of serious irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed.
Chromogenic TMB concentrate contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes.

5.2) Residual risks

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

5.3) Specimen Collection and Preparation for Analysis

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

5.3.6) WARNING

1. The specimen must not contain any AZIDE compounds, which can inhibit the peroxidase activity of the conjugate.
2. Incompletely coagulated serum samples and microbial-contaminated specimens should not be used.

5.4) Reagents storage

- 5.4.1) The kit must be stored at +2 to +8°C. Do not freeze.
- 5.4.2) Strips of the plate should be used within one month after opening the original aluminum foil bag. The unused strips should be kept in the aluminum foil bag and taped tightly.
- 5.4.3) Return reagents to +2 to +8°C immediately after use.
- 5.4.4) Washing Solution (20x) Concentrate can be stored at room temperature to avoid crystallization.

5.5) Plate washing procedure

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

WARNING

Improper washing will cause false results.

5.6) Test procedure

Assay process can be performed by automatic EIA micro-plate immuno-analyzer, please set up the program according to the following test procedure.

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

(A) HBeAg Detection

5.6.2a) Reserve 1 well for blanks. Add 100 µl of each control or specimen to appropriate wells of reaction plate (3 Negative Controls and 2 HBeAg Positive Controls).

NOTE:

- a. Use a clean pipette tip for each sampling to avoid cross-contamination
- b. Each plate needs its own negative controls, positive controls and blank wells.
- c. Do not use cut-off value of other plate.

5.6.3a) Gently tap the plate.

5.6.4a) Remove the protective backing of the adhesive slip and press it on the plate, so that it is tightly sealed.

5.6.5a) Incubate the plate in a 37±1°C incubator or water bath for 1 hour.

5.6.6a) At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive slip and wash the plate as described under plate washing procedure section 5.4.

5.6.7a) Add 100 µl of Anti-HBe - Peroxidase Solution into each reaction well except 1 blank.

NOTE : Do not touch the well wall for preventing contamination.

5.6.8a) Gently tap the plate.

5.6.9a) Remove the protective backing from the adhesive slip and press it onto the reaction plate, so that it is tightly sealed.

5.6.10a) Incubate the reaction plate in a 37±1°C water bath or incubator for 1 hour.

5.6.11a) At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive slip and wash the plate in accordance with 5.4 Plate washing procedure.

5.6.12a) Select one of the following two methods for color development:

A) Mix equal volumes of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer in a clean container immediately prior to use.

Add 100 µl of the mixture solution to each well including the blank well.

or

B) Add 50 µl of Chromogenic TMB concentrate first, and then add 50 µl of Substrate buffer into each well including the blank.

Carefully mix well.

NOTE:

Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue; otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and substrate buffer should be used within 30 minutes after mix. The mixture should be avoided from intense light.

5.6.13a) Cover the plate with a black cover and incubate at room temperature for 15 minutes.

5.6.14a) Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well including the blank.

5.6.15a) Determine the absorbance of Controls and test specimens within 30 minutes with a precision photometer at 450 / 620-690 nm (450 nm reading wavelength with 620-690 nm reference wavelength)*1. Use the blank well to blank photometer.

NOTE:

The color of the blank should be colorless to light yellowish; otherwise, the test results are invalid.

Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100.

(B) Anti-HBe Detection

5.6.2b) Reserve 1 well for blank. Add 50 µl of each control or specimen to appropriate wells of reaction plate (3 Negative Controls and 2 Anti-HBe Positive Controls).

NOTE:

Use a clean pipette tip for each sampling to avoid cross-contamination

Each plate needs its own negative controls, positive controls and blank wells.

Do not use cut-off value of other plate.

5.6.3b) Add 50 µl of Neutralizing Solution for Anti-HBe into each well except 2 blank wells.

NOTE: Use an individual tip for each sample to avoid cross-contamination.

5.6.4b) Gently tap the plate.

5.6.5b) Remove the protective backing of the adhesive slip and press it on the plate, so that it is tightly sealed.

5.6.6b) Incubate the plate in a 37±1°C incubator or water bath for 1 hour.

5.6.7b) At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive slip and wash the plate in accordance with wash the plate as described under plate washing procedure section 5.4.

5.6.8b) Add 100 µl of Anti-HBe - Peroxidase Solution into each reaction well except 2 blanks.

NOTE: Do not touch the well wall for preventing contamination.

5.6.9b) Gently tap the plate.

5.6.10b) Remove the protective backing from the adhesive slip and press it onto the reaction plate, so that it is tightly sealed.

5.6.11b) Incubate the reaction plate in a 37±1°C water bath or incubator for 1 hour.

5.6.12b) At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive slip and wash the plate in accordance with 5.4. Plate washing procedure.

5.6.13b) Select one of the following two methods for color development:

A) Mix equal volumes of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer in a clean container immediately prior to use.

Add 100 µl of the mixture solution to each well including the blank well.

or

B) Add 50 µl of Chromogenic TMB concentrate first, and then add 50 µl of Substrate buffer into each well including the blank. Carefully mix well.

NOTE:

Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue; otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer should be used within 30 minutes after mix. The mixture should be avoided from intense light.

5.6.14b) Cover the plate with a black cover and incubate at room temperature for 15 minutes.

5.6.15b) Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well including the blank.

5.6.16b) Determine the absorbance of Controls and test specimens within 30 minutes with a precision photometer at 450 / 620-690 nm (450 nm reading wavelength with 620-690 nm reference wavelength)*1. Use the blank well to blank photometer.

NOTE:

The color of the blank should be colorless to light yellowish; otherwise, the test results are invalid.

Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100.

5.7) Calculation of the tested data

(A) HBeAg Detection

5.7.1a) Calculation of the NCx (Mean Absorbance of Negative Control).

Example: Sample No.	Absorbance
1	0.025
2	0.028
3	0.022

$NCx = (0.025+0.028+0.022)/3 = 0.025$

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

5.7.2a) Calculation of the PCx (Mean Absorbance of Positive Control)

Example: Sample No.	Absorbance
1	1.246
2	1.202

$PCx = (1.246 + 1.202) / 2 = 1.224$

PCx must be ≥ 0.4, otherwise, the test is invalid.

5.7.3a) Calculation of the P - N Value

P - N = PCx - NCx

Example: P - N = 1.224 - 0.025 = 1.224

P - N Value must be ≥ 0.3, otherwise, the test is invalid.

5.7.4a) Calculation of the Cutoff Value

Cutoff Value = NCx + 0.06

Example: Cutoff Value = 0.025 + 0.06 = 0.085

5.7.5a) Calculation of the Retest Range

Retest Range = Cutoff Value ± 10%

Retest Range = (0.085 - 0.009) to (0.085 + 0.009) = 0.076 to 0.094

5.7.6a) Quality Control of the Test Run

5.7.6.1a) NCx should be ≤ 0.1, otherwise, the test is invalid.

5.7.6.2a) PCx should be ≥ 0.4, otherwise, the test is invalid.

5.7.6.3a) P - N Value must be ≥ 0.3, otherwise, the test is invalid.

(B) Anti-HBe Detection

5.7.1b) Calculation of the NCx (Mean Absorbance of Negative Control).

Example: Sample No.	Absorbance
1	0.888
2	0.915
3	0.909

$NCx = (0.888+0.915+0.909)/3 = 0.904$

NCx must be ≥ 0.4, otherwise, the test is invalid.

5.7.2b) Calculation of the PCx (Mean Absorbance of Positive Control)

Example: Sample No.	Absorbance
1	0.044
2	0.056

$PCx = (0.044+0.056)/2 = 0.050$

PCx must ≤ 0.1, otherwise, the test is invalid.

5.7.3b) Calculation of the N - P Value

N - P = NCx - PCx

Example: N - P = 0.904 - 0.050 = 0.854

N - P Value must be ≥ 0.3, otherwise, the test is invalid.

5.7.4b) Calculation of the Cutoff Value

Cutoff Value = (NCx + PCx) / 2

Example: Cutoff Value = Cutoff Value = (0.904 + 0.050) / 2 = 0.477

5.7.5b) Calculation of the Retest Range

Retest Range = Cutoff Value \pm 10%

Retest Range = (0.477 - 0.048) to (0.477 + 0.048) = 0.429 to 0.525

5.7.6b) Quality Control of the Test Run

5.7.6.1b) NCx should be \geq 0.4, otherwise, the test is invalid.

5.7.6.2b) PCx should be \leq 0.1, otherwise, the test is invalid.

5.7.6.3b) N - P Value must be \geq 0.3, otherwise, the test is invalid.

5.8) Result interpretation

(A) HBeAg Detection

5.8.1a) Specimens with absorbance values less than (0.9 X Cutoff Value) are considered **NON-REACTIVE** and are considered **NEGATIVE** for HBeAg.

5.8.2a) Specimens with absorbance value greater than (1.1 X Cutoff Value) are considered **REACTIVE** and are considered **POSITIVE** for HBeAg.

5.8.3a) Specimens with absorbance value within the Retest Range (Cutoff Value \pm 10%) shall be repeated in duplicate and interpreted as above. Specimens with any of the repeat results in the retest range are reported as "indeterminate". It is suggested to test follow-up samples for "indeterminate" results.

(B) Anti-HBe Detection

5.8.1b) Specimens with absorbance values greater than (1.1 X Cutoff Value) are considered **NON-REACTIVE** and are considered **NEGATIVE** for Anti-HBe.

5.8.2b) Specimens with absorbance value less than (0.9 X Cutoff Value) are considered **REACTIVE** and are considered **POSITIVE** for Anti-HBe.

5.8.3b) Specimens with absorbance value within the Retest Range (Cutoff Value \pm 10%) shall be repeated in duplicate and interpreted as above. Specimens with any of the repeat results in the retest range are reported as "indeterminate". It is suggested to test follow-up samples for "indeterminate" results.

5.9) Troubleshooting

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

5.9.1) Improper washing procedure.

5.9.2) Contamination with positive specimen.

5.9.3) Wrong volume of sample, conjugate or substrates.

5.9.4) Contamination of the well rim with conjugate.

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

5.9.6) Wrong incubation time or temperature.

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

5.9.8) Insufficient aspiration.

5.10) Limitations and Interferences

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

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

5.10.3) Non-repeatable false positive results may be obtained with any enzyme immunoassay kit, largely due to technical error either from the part of the operator or malfunction of apparatus used.

5.10.4) Repeatable false reactive results (\leq 2%) may occasionally be obtained.

5.10.5) An Anti-HBe or HBeAg negative result without other evidence does not preclude the possibility of previous infection with hepatitis Be virus.

5.10.6) A (low) positive result in the HBeAg / Anti-HBe Elisa is no proof of protection and such it should be not used to exclude an infection by hepatitis Be virus.

5.10.7) Anti-HBe positive specimens may not always show linear serial dilution properties as in serial dilution of standard material.

5.10.8) Potential Interfering Substances:

The following results were obtained in respective experiments:

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

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

3. No cross reactivity was detected using specimens deriving from patients with other infections by HAV, EBV, CMV, HSV I, HSV II, Rubella, Toxoplasmosa, HCV, HIV, Anti-HBe(+), aHBe(+).

4. Samples containing potential interfering substances [e.g serum, anticoagulants EDTA, Citrate, Heparin and the lipemic, hemolytic, icteric samples with high monoclonal and elevated levels of autoimmune antibodies do not interfere with the test result] and samples from pregnant women did not interfere with the HBeAg/Anti-HBe Elisa assay.

5.11) Performance characteristics

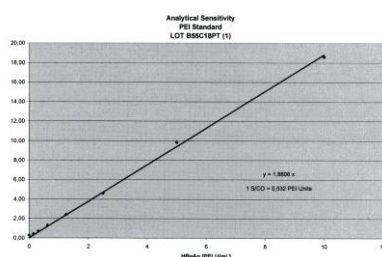
5.11.1) HBeAg Assay

5.11.1.1) Analytical Specificity

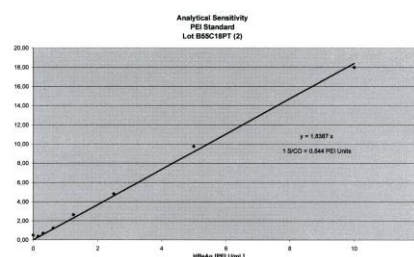
Spiking experiment with HBeAg material performed with paired non-reactive serum and plasma samples with the three anticoagulants to show equivalence in the test results between serum and different types of plasma in the HBeAg/Anti-HBe Elisa test. The lipemic, hemolytic, icteric samples and samples with high monoclonal and elevated levels of autoimmune antibodies do not interfere with the test result. Pregnancy is not influencing the test result HBeAg. No false positive and false negative results are observed with samples with these characteristics.

5.11.1.2) Analytical Sensitivity

1a)



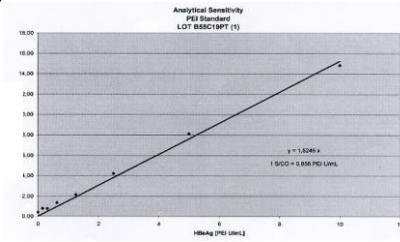
1b)



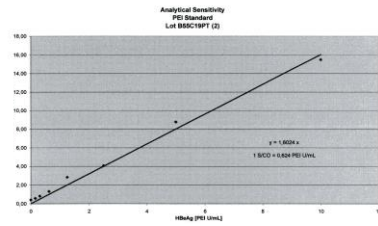
Catalogue Nr:

The figures 1a and b show two serial dilutions of the PEI HBeAg standard with lot B55C18PT. The calculated analytical sensitivity was 0.532 and 0.544 PEI Units/mL.

2a)



2b)



The figures 2a and b show two serial dilutions of the PEI HBeAg standard with lot B55C19PT. The calculated analytical sensitivity was 0.656 and 0.624 PEI Units/mL.

For HBeAg the values determined were 0.532; 0.544; 0.656; 0.624:
The mean for HBeAg sensitivity would be **0.59 PEI units/mL ± 0.06**

5.11.1.3) Antigen Excess/High-dose hook effect

To test the antigen excess/high-dose hook effect a serum, which was spiked with HBeAg to a concentration of 10,000 PEI U/mL, and was tested with the two evaluated lots of DIAsource HBeAg/Anti-HBe Elisa. No high-dose hook effect was detected with both tested lots.

5.11.1.4) Diagnostic Specificity

Results from the European Performance Evaluation for DIAsource HBeAg / ANTI-HBe ELISA HBeAg - Reactivity of HBV Negative "Donor" and "Clinical" Specimens.

HBeAg negative Sample	DIAsource	Abbott
Hospitalized patients	111	112
Potential interfering samples	98	100
Total	209	212

Diagnostic specificity = 111 / 112 = 99.11 %
The specificity of the assay for the clinical population is 99.11%.

5.11.1.5) Diagnostic sensitivity

5.11.1.5.1) HBV infected individuals 1. The diagnostic sensitivity determined in the European performance evaluations yielded

the following results:

Sample	No. of sample	Reactive	Sensitivity
HBeAg positive sera	200	197	98.5%

Diagnostic sensitivity = 197/200 = 98.5%

5.10.1.5.2) Commercial seroconversion panels

Two commercially available HBV seroconversion panels Profile Diagnostics RP-016 and RP-009, consisting of follow-up samples which were collected at weekly or monthly intervals from patients suffering from acute hepatitis B, were used. All the panels have been characterized for HBV-specific serological markers (HBeAg, Anti-HBe, anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc-IgM, and HBsAg).

Panel-ID	HBeAg / ANTI-HBe ELISA	Abbott AxSym	Difference
PD RP-016	2 pos bleeds (days 57 and 60)	2 pos bleeds (days 57 and 60)	No difference
PD RP-009	7 pos bleeds, 1 bleed in the gray zone (days 13 (GZ), 29, 31,36, 53, 56, 69, 81)	9 pos bleeds, (days 11, 13, 29, 31,36, 53, 56, 69, 81)	Abbott Axsym was reactive 2 bleeds earlier or 2 days earlier.

Summary of the evaluation of all tested Seroconversion Panels:

Panel RP-016 shows identical results whether in panel RP-009 the Abbott Axsym detects the first positive bleed at day 11 and the HBeAg/Anti-HBe Elisa has a result in the grey zone on day 13. This difference is not important in the routine diagnostics, because HBeAg is only a follow up parameter in the hepatitis B diagnostic and not a screening parameter.

5.11.1.6) Evaluation of Precision

5.11.1.6.1) Accuracy: intra-run repeatability and inter-run reproducibility

The positive control of the HBeAg/Anti-HBe Elisa assay 44.0 PEI U/ml and one serum sample with HBeAg level just above cutoff and at medium level. The results were used to calculate the intra-run repeatability and inter-run reproducibility as presented in the following tables.

Test Item	Sample size	Test Result	Acceptance Range
Positive Control	N = 22	2.12%	CV of COI* ≤ 15%
	N = 22	2.42%	
	N = 22	3.15%	
PC/4	N = 66	2.76%	CV of COI ≤ 25%
	N = 36	4.90%	CV of COI ≤ 25%
	N = 36	4.42%	
	N = 108	5.68%	CV of COI ≤ 30%
	N = 108	5.28%	

* COI = cut-off index (identical to S/Co)

5.11.1.7) Traceability

DIAsource HBeAg/Anti-HBe Elisa Master Calibrator has been calibrated against the PEI HBeAg Standard using the HBeAg/Anti-HBe Elisa assay. The relative potency (ratio) of the Paul Ehrlich Institute (PEI) Standard for HBeAg versus the DIAsource HBeAg Master Calibrator is 1.187 (1.102-1.281 95% CI). The concentration of the Positive Control of HBeAg / Anti-HBe ELISA assay has been determined against the DIAsource HBeAg Master Calibrator and was established with 44.0 PEI U/ml.

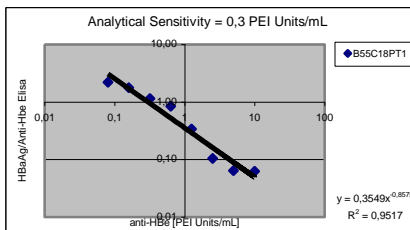
5.11.2) Anti-HBe Assay

5.11.2.1) Analytical Specificity

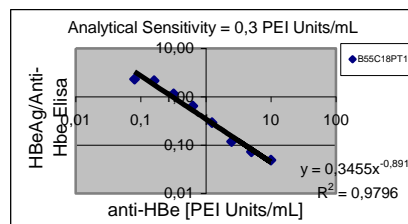
Spiking experiment with Anti-HBe material performed with paired non-reactive serum and plasma samples with the three anticoagulants to show equivalence in the test results between serum and different types of plasma in the HBeAg/Anti-HBe Elisa test. The lipemic, hemolytic, icteric samples and samples with high monoclonal and elevated levels of autoimmune antibodies do not interfere with the test result. Pregnancy is not influencing the test result Anti-HBe. No false positive and false negative results are observed with samples with these characteristics.

5.11.2.2) Analytical Sensitivity

1a)

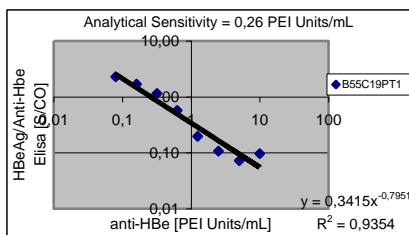


1b)

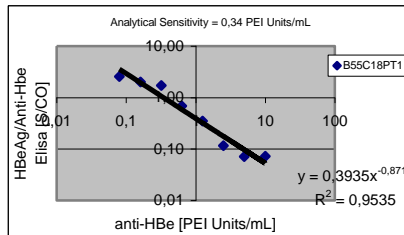


The figures 1a and b show two serial dilutions of the PEI Anti-HBe standard with lot B55C18PT. The calculated analytical sensitivity was 0.30 PEI Units/mL.

2a)



2b)



The figures 2a and b show two serial dilutions of the PEI Anti-HBe standard with lot B55C19PT. The calculated analytical sensitivity was 0.30 PEI Units/mL.

For Anti-HBe the values determined were 0.30; 0.30; 0.26; 0.34:
The mean for Anti-HBe sensitivity would be **0.3 PEI units/mL ± 0.033**

5.11.2.3) Antigen Excess/High-dose hook effect

Due to the competitive assay format a high-doses hook effect can not occur.

5.11.2.4) Diagnostic Specificity

Results from the European Performance Evaluation for DIAsource HBeAg / ANTI-HBe ELISA Anti-HBe - Reactivity of HBV Negative "Donor" and "Clinical" Specimens.

Anti-HBe negative Sample	DIAsource	Abbott
Unselected samples	200	200
Hospitalized patients	196	197

Diagnostic specificity = 196 / 197 = 99.49 %
The specificity of the assay for the clinical population is 99.49%.

5.11.2.5) Diagnostic sensitivity

5.11.2.5.1) HBV infected individuals

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

Sample	No. of sample	Reactive	Sensitivity
HBeAg positive sera	201	199	99.0%

Diagnostic sensitivity = 199/201 = 99.0%

5.11.2.5.2) Commercial of the seroconversion panels:

Two commercially available HBV seroconversion panels Profile Diagnostics RP-016 and RP-009, consisting of follow-up samples which were collected at weekly or monthly intervals from patients suffering from acute hepatitis B, were used. All the panels have been characterized for HBV-specific serological markers (HBeAg, Anti-HBe, anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc-IgM, and HBsAg).

Panel-ID	HBeAg / ANTI-HBe ELISA	Abbott AxSym	Difference
RP-016	8 pos bleeds (days 107, 109, 114, 116, 121, 123, 128, 157)	10 pos bleeds (days 81, 88, 107, 109, 114, 116, 121, 123, 128, 157)	Abbott AxSym was reactive 2 bleeds earlier or 26 days earlier.
RP-009	7 pos bleeds (days 88, 98, 109, 123, 133, 166, 186)	9 pos bleeds, (days 88, 98, 109, 123, 133, 152, 166, 186, 202)	Abbott AxSym was reactive at to more bleeds at day 152 und 186

Summary of the evaluation of all tested Seroconversion Panels:

Panel RP-016 shows difference of two bleeds in detecting Anti-HBe seroconversion where in panel RP-009 the Abbott AxSym detected the first positive bleed and the HBeAg/ Anti-HBe detected the seroconversion the same bleed, but is two more bleeds reactive. This difference is not important in the routine diagnostics, because Anti-HBe is only a follow up parameter in the hepatitis B diagnostic and not a screening parameter.

5.10.2.6) Evaluation of Precision

5.11.2.6.1) Accuracy: intra-run repeatability and inter-run reproducibility

The negative control of the HBeAg/ Anti-HBe assay and one serum sample with Anti-HBe level just above cutoff and at medium level. The results were used to calculate the intra-run repeatability and inter-run reproducibility as presented in the following tables.

Test Item	Sample size	Test Result	Acceptance Range
Negative Control	intra-run	N = 36	3.71%
		N = 36	3.39%
		N = 36	4.03%
	inter-run	N = 108	2.78%
PC/20	intra-run	N = 36	7.40%
		N = 36	7.51%
		N = 36	7.15%
	inter-run	N = 108	5.51%

* COI = cut-off index (identical to S/Co)

5.11.2.7) Traceability

DIAsource Anti-HBe Master Calibrator has been calibrated against the PEI Anti-HBe Standard using the HBeAg/ Anti-HBe assay. The relative potency (ratio) of the Paul Ehrlich Institute (PEI) Standard for Anti-HBe versus the DIAsource Anti-HBe Master Calibrator is 1.115 (1.068-1.162 95% CI). The concentration of the Positive Control of HBeAg / Anti-HBe ELISA assay has been determined against the DIAsource Anti-HBe Master Calibrator and was established with 9.0 PEI U/ml.

5.12) Flow chart of the test procedure

The Simplified procedure is only for the experienced users. New users are advised to read and follow the detailed. Test procedure carefully.

HBeAg ASSAY

PROCEDURE

Incubation: 37° C, 1hr.

37° C, 1hr.

Add 100µl controls (3 X NC, 2 X PC) and add 100µl per Specimen into wells. Reserve 1 well for blanks.



Incubate the plate at 37°C for 1 hour



Wash the plate.



Add 100µl of Anti-HBe - Peroxidase Solution into each reaction well, except blank.



Incubate the plate at 37°C for 1 hour



Anti-HBe ASSAY

PROCEDURE

Incubation: 37° C, 1 hr.

37° C, 1 hr.

Add 50µl controls (3XNC, 2XPC) and add 50µl per Specimen into the appropriate wells. Then add 50µl of Neutralizing Solution to each well. Reserve 1 well for blanks.



Incubate the plate at 37°C for 1 hour



Wash the plate.



Add 100µl of Anti-HBe - Peroxidase Solution into each reaction well, except blank.



Incubate the plate at 37° C for 1 hour



Wash the plate

(Choose one of the following two methods for color development)



Mix equal volume of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer. Add 100µl of the mixed solution to wells.



Add 50µl of Chromogenic TMB concentrate to wells and then add 50µl of Substrate buffer. Mix well, gently.



Incubate at R.T. for 30 minutes



Add 100µl of stop solution into each well.



Determine absorbance at 450 nm/620-690 nm⁻¹

6) BIBLIOGRAPHY

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

Revision date : 2019-10-24



HBeAg/Anti-HBe Elisa

es

Para la detección in-vitro de HBeAg y Anti-HBe en suero o plasma humano

KAPG4BNE3

PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO IVD

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

1) USO PREVISTO

El kit de diagnóstico ELISA HBeAg / ANTI-HBe es un inmunoensayo para la detección cualitativa in-vitro de HBeAg y Anti-HBe en suero o plasma humano.

2) RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

2.1) Para la detección de HBeAg

Para la detección de HBeAg, ELISA HBeAg / ANTI-HBe adopta el “principio del sándwich” (Anticuerpo Antígeno Anticuerpo) como base del ensayo. Cuando los pocillos recubiertos con Anti-HBe y el conjugado Anti-HBe HRPO se incuban con muestras que contienen HBeAg, se forman complejos en los pocillos (anticuerpo)-(antígeno) - (anticuerpo HRPO). Después de lavar para eliminar el material que no se ha unido, se agrega el sustrato TMB y se desarrolla el color en proporción a la cantidad de HBeAg unido. El desarrollo del color se detiene agregando solución de parada. La Densidad Óptica del color que se ha desarrollado se lee con un espectrofotómetro a 450 nm/620-690 nm*.

La descripción anterior se muestra en el siguiente diagrama.

A Muestra que contiene HBeAg:

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

B Muestra sin HBeAg:

1. (Placa)-(Anti-HBe) + muestra (sin HBeAg) + Anti-HBe- peroxidasa → (placa)-Anti-HBe
2. (placa)-Anti-HBe + solución de sustrato TMB → incoloro a color azul palido
3. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color → Lea la DO a 450nm/620-690 nm*

2.2) Para la detección de Anti-HBe

Para la detección de Anti-HBe, ELISA HBeAg / ANTI-HBe adopta el “Principio de Neutralización”. Cuando la muestra se incubaba con la Solución Neutralizante para anti HBe en el (los) pocillo(s) recubiertos con Anti-HBe, el HBeAg de la Solución Neutralizante será neutralizado por el Anti-HBe en la muestra. A mayor concentración de Anti-HBe, menor será la cantidad restante de HBeAg, y por consiguiente menor será la Densidad Óptica desarrollada. La descripción está ilustrada en el siguiente diagrama

A Muestra que contiene Anti-HBe:

1. (Pocillo de la placa)-Anti-HBe + Muestra (Anti-HBe) + Solución Neutralizante (HBeAg)
→ (Pocillo de la placa)-Anti-HBe-HBeAg y HBeAg-Anti-HBe
Después de lavar, solo quedan en los pocillos de la placa (Pocillo de la placa)-Anti-HBe-HBeAg.
2. (Pocillo de la placa)-Anti-HBe HBeAg + Anti-HBe-HRPO
→ (Pocillo de la placa)-Anti-HBe-HBeAg (Anti-HBe-HRPO) complejo de sándwich
3. (placa)-Anti-HBe + solución de sustrato TMB → incoloro a color azul celeste
4. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color → Lea la DO a 450nm/620-690 nm*

5. B Muestra sin anti-HBe:

1. (Pocillo de la placa)-Anti-HBe + Muestra (sin Anti-HBe) + Solución Neutralizante (HBeAg) → (Pocillo de la placa)-Anti-HBe-HBeAg
2. (Pocillo de la placa)-Anti-HBe-HBeAg + Anti-HBe-HRPO → (Pocillo de la placa)-Anti-HBe-HBeAg (Anti-HBe-HRPO) complejo de sándwich
3. complejo de sándwich + solución de sustrato TMB → color azul
4. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color → Lea la DO a 450nm/620-690 nm*

3) DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO


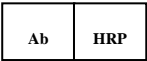
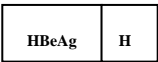
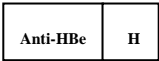
La fase sólida del ELISA HBeAg / ANTI-HBe está formada por los pocillos de poliestireno recubiertos con Anti-HBe; Anti-HBe se usa para preparar el conjugado de peroxidasa (rábano picante) Anti-HBe en fase líquida. En la detección de HBeAg, las muestras que no son reactivas con ELISA HBeAg / ANTI-HBe ELISA se consideran negativas para HBeAg. Las muestras cuyas absorbancias son MENORES de 0,9 X Valor de Corte se consideran NO-REACTIVAS para HBeAg según el criterio del ELISA HBeAg / ANTI-HBe. Las muestras con absorbancias MAYORES de 1,1 X Valor de Corte se consideran REACTIVAS para HBeAg. Para muestras con absorbancias dentro del Rango de Repetición (Valor de Corte \pm 10%), el ensayo debe ser repetido en duplicado e interpretado como se ha indicado.

En la detección de Anti-HBe, las muestras que no son reactivas con ELISA HBeAg / ANTI-HBe se consideran negativas para Anti-HBe. Las muestras con absorbancias mayores de 1,1 X Valor de Corte se consideran NO-REACTIVAS para Anti-HBe según el criterio de ELISA HBeAg / ANTI-HBe. Las muestras con absorbancias menores de 0,9 X Valor de Corte son consideradas REACTIVAS para Anti-HBe. Para las muestras con valores de absorbancia dentro de Rango de Repetición (Valor de Corte 10%), se debe repetir el ensayo e interpretar como se ha indicado.

4) DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS

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

Microplaca recubierta con anticuerpo anti-HBe.

ITEMS	Componentes	Descripción	Cant. para 96 ensayos
(1)	Anti-HBe Placa 	Una microplaca recubierta con anticuerpo anti-HBe.	1 placa
(2)	Solución Anti-HBe • Peroxidasa 	Contiene anti-HBe • conjugado de peroxidasa (rábano picante) disuelto en estabilizadores de proteínas. Preservativos: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 vial, 11 ml
(3)	HBeAg Positive Control 	Contiene suero positivo para HBeAg diluido en un tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial 1.5 ml
(4)	Control Positivo Anti-HBe 	Suero positivo para Anti-HBe en un tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 1,5 ml

(5)	Control Negativo HB <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>L</td> </tr> </table>	CONTROL	L	Contiene suero humano normal, sin HBeAg, Anti-HBe y HBsAg. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 2 ml	
CONTROL	L					
(6)	Solución Neutralizante para Anti-HBe <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> </tr> </table>	NEUTR	SOLN	Suero positivo para HBeAg en un tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 7 ml	
NEUTR	SOLN					
(7)	Concentrado Cromogénico TMB <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> <td>CONC</td> </tr> </table>	CHROM	TMB	CONC	0,6 mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en una base orgánica	1 vial, 12 ml
CHROM	TMB	CONC				
(8)	Tampón del Sustrato <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>SUB</td> <td>BUF</td> </tr> </table>	SUB	BUF	Tampón de ácido cítrico con 0,03% H ₂ O ₂ .	1 vial, 12 ml	
SUB	BUF					
(9)	Solución de Lavado Conc. (20x) <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table>	WASH	SOLN	CONC	Tampón concentrado de fosfato con Tween-20	1 vial 58 ml
WASH	SOLN	CONC				
(10)	Solución de Parada <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table>	STOP	SOLN	2N H ₂ SO ₄ (ácido sulfúrico)	1 vial 12 ml	
STOP	SOLN					

● OTROS MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

4.1) CONDICIONES DE ALMACENAJE Y ESTABILIDAD DEL KIT*




Kit/componentes	Condición de almacenaje	Estado	Estabilidad
HBeAg / ANTI-HBe ELISA KIT	+2 to +8°C	Original	10 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control positivo HBeAg	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control positivo Anti-HBe	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control Negativo HB	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Placa Anti-HBe	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución Conjugado Anti-HBe • Peroxidasa	+2 to +8°C	Original	10 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución Neutralizante para Anti-HBe	+2 to +8°C	Original	15 meses

		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Concentrada (20x)	Temp ambiente.	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Diluida 20x	Temp ambiente.	Diluido	2 días
	+2 to +8°C	Diluido	1 semana
Concentrado TMB cromogénico	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Tampón del sustrato	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Parada	Temp ambiente.	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes

5) INSTRUCCIONES DE USO

5.1) Advertencias:

- 5.1.1) Este kit de reactivos es sólo para uso profesional.
- 5.1.2) Este kit de reactivos es sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- 5.1.3) Procure que todos los reactivos del kit y las muestras alcancen temperatura ambiente (+20 to +30 °C) y mézclelos cuidadosamente antes de usar.
- 5.1.4) No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- 5.1.5) No intercambie reactivos entre lotes diferentes.
- 5.1.6) No pipetee con la boca.
- 5.1.7) No fume o coma en zonas donde se manipulan muestras o reactivos.
- 5.1.8) El control positivo, negativo, solución del conjugado y las muestras deben considerarse como peligros potenciales para la salud. Deben usarse y eliminarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio del usuario. Estos procedimientos de seguridad probablemente incluirán el uso guantes de protección y evitar la generación de aerosoles.
- 5.1.9) Las muestras potencialmente infecciosas y derrames o goteos que no contienen ácidos deben ser limpiados concienzudamente con hipoclorito de sodio al 5% o tratado de acuerdo con las prácticas del laboratorio para el control de un potencial riesgo biológico.
- 5.1.10) Antes de eliminar los desechos de las muestras usadas y reactivos del kit como desechos generales, estos deben ser tratados de acuerdo con el procedimiento local para desecho con potencial riesgo biológico o tratado como sigue:**
Tanto los desechos sólidos como los líquidos deben ser autoclavados a +121 °C por lo menos por 30 minutos.
El desecho sólido también se puede incinerar.
El desecho líquido no ácido puede tratarse con hipoclorito de sodio diluido a una concentración final de 1%.
Los desechos ácidos deben ser neutralizados antes de tratarlos con hipoclorito de sodio como se mencionó antes y debe mantenerse por 30 minutos para obtener una desinfección efectiva.

- 5.1.11)  La solución de parada es irritante para los ojos, la piel, vías respiratorias y membranas mucosas. Evite el contacto de la solución de parada con la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lave con copiosa cantidad de agua inmediatamente. En caso de inhalación, proporcione aire fresco y busque ayuda médica en caso de molestias.
- 5.1.12)   El concentrado cromogénico TMB contiene disolvente orgánico que es tóxico: peligro de efectos graves irreversibles por inhalación, contacto con la piel o ingestión. El concentrado cromogénico TMB contiene dimetil sulfóxido, un irritante para la piel y membranas mucosas.

5.2) Riesgos residuales

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

5.3) Toma de Muestra y Preparación para el Análisis

- 5.3.1) El paciente no requiere preparación especial antes de la toma de la muestra. La sangre debe ser tomada con técnicas médicas aprobadas.
- 5.3.2) Se puede usar tanto suero como plasma (**EDTA, Citrato o Heparina**) con este kit diagnóstico. La muestra de sangre total debe separarse lo antes posible para evitar hemólisis. Cualquier partícula presente en la muestra (por ej. glóbulos rojos, coágulos de fibrina) deben eliminarse antes de usar.
- 5.3.3) Las muestras deben almacenarse de +2 a +8 °C y evitar inactivación por calor para minimizar el deterioro. Para almacenar por periodos largos, las muestras se deben congelar por debajo de -20 °C. No se recomienda almacenarlas en congeladores que se auto descongelan.
- 5.3.4) Las muestras congeladas deben ser descongeladas completamente y mezcladas en forma homogénea antes del ensayo.
- 5.3.5) Evite congelar y descongelar en forma sucesiva
- 5.3.6) **ADVERTENCIA**
1. La muestra no debe contener compuestos de azida que puedan inhibir la actividad de la peroxidasa en el conjugado.
 2. Muestras de suero coaguladas y muestras con contaminación bacteriana no deben ser usadas

5.4) Almacenaje del kit

- 5.4.1) El kit debe almacenarse entre + 2 y +8 °C. No congelar.
- 5.4.2) Las tiras de las microplacas deben ser usadas dentro de un mes después de abierta la bolsa original de aluminio.
- 5.4.3) Almacene los reactivos nuevamente entre +2 y +8 °C inmediatamente después de su uso.
- 5.4.4) El concentrado (x20) de la solución de lavado es almacenado y transportado entre +2 y +8 °C, lo que puede causar cristalización.

5.5) Procedimiento de lavado de placas

5.5.1) Preparación de la solución de lavado:

Diluya la solución de Lavado (x20) con agua destilada o desionizada a una dilución de 1:20. No use agua del grifo.

5.5.2) Lavado de las placas:

- (a) Para un lavador de placas con función de aspiración de desborde: 6 ciclos de por lo menos 0,5 ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo
- o
- (b) Para un lavador sin la función de aspiración de desborde: 8 ciclos de por lo menos 0,35ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo.
- 5.5.3) Seque invirtiendo la placa sobre un papel absorbente y golpeándola enérgicamente. Si queda demasiado tampón de lavado residual, podría causar resultados falsos.

¡ADVERTENCIA!

Un lavado inadecuado causará resultados falsos.

5.6) Procedimiento del Ensayo

El ensayo puede ser realizado por un analizador automático de microplacas para inmunoensayos. Prepare el programa de acuerdo con el siguiente procedimiento.

- 5.6.1) Asegúrese de que todos los reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente (+20 a +30 °C) antes del ensayo. Ajuste el baño maría o incubadora a +37±1 °C.

(A) Detección de HBeAg

- 5.6.2a) Reserve 1 pocillo para el blanco. Agregue 100µl de cada control o muestra a los pocillos correspondientes en la placa donde ocurrirá la reacción (3 Controles Negativos y 2 Controles Positivos HBeAg).

NOTA:

- a) Use una punta nueva de pipeta para cada muestra para evitar contaminación cruzada
- b) Cada placa necesita sus propios controles negativos, positivos y pocillo blanco.
- c) No use el valor de corte establecido para otras placas.

- 5.6.3a) Golpee la placa suavemente.

- 5.6.4a) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.

- 5.6.5a) Incube la placa a +37±1°C en baño maría o una incubadora por 1 hora.

- 5.6.6a) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo 5.4.

- 5.6.7a) Agregue 50 µl de solución de anti-HBc• Peroxidasa a cada pocillo excepto en el blanco.

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

- 5.6.8a) Golpee la placa suavemente.

- 5.6.9a) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.

- 5.6.10a) Incube la placa a +37±1°C en baño maría o una incubadora por 1 hora.

5.6.11a) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo 5.4.
PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS

5.6.12a) Seleccione uno de los dos métodos siguientes para desarrollar el color:

A. Mezcle volúmenes iguales de concentrado cromogénico TMB y Tampón de sustrato en un recipiente limpio inmediatamente antes de usar. Agregue 100 µl de la solución de la mezcla a cada pocillo incluyendo el pocillo del blanco.

B. Agregue primero 50 µl de concentrado cromogénico TMB y luego agregue 50 µl de Tampón del sustrato a cada pocillo incluyendo el blanco. Mezcle suavemente.

NOTA: El concentrado cromogénico TMB debe ser entre incoloro y celeste; de otro modo debe ser eliminado. La mezcla de concentrado cromogénico TMB con tampón del sustrato debe usarse dentro de 30 minutos a partir del momento de la mezcla. La mezcla debe protegerse de la luz intensa.

5.6.13a) Cubra la placa con la cubierta negra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.

5.6.14a) Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo el blanco.

5.6.15a) Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 30 minutos con un fotómetro de precisión a 450 / 620-690 nm (Longitud de onda de 450 nm para la lectura con 620-690 nm de longitud de onda de referencia)*1. Use el primer blanco para blanquear el fotómetro.

NOTA:

El color del blanco debe ser de incoloro a amarillento pálido; de otro modo el ensayo es inválido.

[Blanco del sustrato: valor de absorbancia debe ser inferior a 0.100](#)

(B) Detección de Anti-HBe

5.6.2b) Reserve 1 pocillo para el blanco. Agregue 100µl de cada control o muestra a los pocillos correspondientes en la placa donde ocurrirá la reacción (3 Controles Negativos y 2 Controles Positivos HBeAg).

NOTA:

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

b) Cada placa necesita sus propios controles negativos, positivos y pocillo del blanco.

c) No use el valor de corte establecido para otras placas.

5.6.3b) Agregue 50 µl de Solución Neutralizante para Anti-HBe a cada pocillo excepto a lo pocillo del blanco.

NOTA: Use una punta nueva de pipeta para cada muestra para evitar contaminación cruzada

5.6.4b) Golpee la placa suavemente.

5.6.5b) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.

5.6.6b) Incube la placa a $+37\pm 1^\circ\text{C}$ en baño maría o una incubadora por 1 hora.

5.6.7b) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo 5.4.

5.6.8b) Agregue 50 µl de solución de anti-HBc• Peroxidasa a cada pocillo excepto en el blanco.

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

5.6.9b) Golpee la placa suavemente.

5.6.10b) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.

5.6.11b) Incube la placa a $+37\pm 1^\circ\text{C}$ en baño maría o una incubadora por 1 hora.

5.6.12b) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo 5.4.

PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS

5.6.13b) Seleccione uno de los dos métodos siguientes para desarrollar el color:

A. Mezcle volúmenes iguales de concentrado cromogénico TMB y Tampón de sustrato en un recipiente limpio inmediatamente antes de usar. Agregue 100 µl de la solución de la mezcla a cada pocillo incluyendo el pocillo del blanco.

B. Agregue primero 50 µl de concentrado cromogénico TMB y luego agregue 50 µl de Tampón del sustrato a cada pocillo incluyendo el blanco. Mezcle suavemente.

NOTA: El concentrado cromogénico TMB debe ser entre incoloro y celeste; de otro modo debe ser eliminado. La mezcla de concentrado cromogénico TMB con tampón del sustrato debe usarse dentro de 30 minutos a partir del momento de la mezcla. La mezcla debe protegerse de la luz intensa.

5.6.14b) Cubra la placa con la cubierta negra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.

5.6.15b) Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo el blanco.

5.6.16b) Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 30 minutos con un fotómetro de precisión a 450 / 620-690 nm (Longitud de onda de 450 nm para la lectura con 620-690 nm de longitud de onda de referencia)*1. Use el primer blanco para blanquear el fotómetro.

NOTA:

El color del blanco debe ser de incoloro a amarillento pálido; de otro modo el ensayo es inválido.

Blanco del sustrato: valor de absorbancia debe ser inferior a 0.100

5.7) Cálculo de los resultados del ensayo

(A) Detección de HBeAg

5.7.1a) Cálculo de la CNx (Absorbancia promedio del Control Negativo).

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.025
2	0.028
3	0.022

$$CNx = (0.025+0.028+0.022)/3 = 0.025$$

CNx debe ser $\leq 0,1$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.2a) Cálculo de CPx (Absorbancia Promedio del Control Positivo)

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	1.246
2	1.202

$$CPx = (1.246 + 1.202) / 2 = 1.224$$

CPx debe ser $\geq 0,4$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.3a) Cálculo del Valor P - N

$$P - N = CNx - CPx$$

Ejemplo: $P - N = 1.224 - 0.025 = 1.224$

El valor N - P debe ser $\geq 0,3$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.4a) Cálculo del Valor de Corte

$$\text{Valor de Corte} = CNx + 0.06$$

Ejemplo: Valor de Corte = $0.025 + 0.06 = 0.085$

5.7.5a) Cálculo del Rango de Repetición

$$\text{Rango de Repetición} = \text{Valor de Corte} \pm 10\%$$

$$\text{Rango de Repetición} = (0.085 - 0.009) \text{ a } (0.085 + 0.009) = 0.076 \text{ a } 0.094$$

5.7.6a) Control de calidad de la Prueba

5.7.6.1a) CNx debe ser $\leq 0,1$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.6.2a) CPx debe ser $\geq 0,4$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.6.3a) Valor de P-N debe ser $\geq 0,3$ de otro modo el ensayo es inválido.

(B) Detección de Anti-HBe

5.7.1b) Cálculo de la CNx (Absorbancia promedio del Control Negativo).

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.888
2	0.915
3	0.909

$$CNx = (0.888+0.915+0.909)/3 = 0.904$$

CNx debe ser $\geq 0,4$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.2b) Cálculo de CPx (Absorbancia Promedio del Control Positivo)

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.044
2	0.056

$$CPx = (0.044+0.056)/2 = 0.050$$

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

5.7.3b) Cálculo del Valor N - P

$$N - P = CPx - CNx$$

$$\text{Ejemplo: } N - P = 0.904 - 0.050 = 0.854$$

El valor P - N debe ser $\geq 0,3$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.4b) Cálculo del Valor de Corte

$$\text{Valor de Corte} = (CNx + PCx)/2$$

$$\text{Ejemplo: Valor de Corte} = (0.904 + 0.050) / 2 = 0.477$$

5.7.5b) Cálculo del Rango de Repetición

$$\text{Rango de Repetición} = \text{Valor de Corte} \pm 10\%$$

$$\text{Rango de Repetición} = (0.477 - 0.048) \text{ a } (0.477 + 0.048) = 0.429 \text{ a } 0.525$$

5.7.6b) Control de calidad de la Prueba

5.7.6.1b) CNx debe ser $\geq 0,4$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.6.2b) CPx debe ser ≤ 0.1 de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.6.3b) Valor de N - P debe ser $\geq 0,3$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.8) Interpretación de los Resultados

(A) Detección de HBeAg

5.8.1a) Las muestras con absorbancias menores de (0,9 x Valor de Corte) se consideran como NO-REACTIVAS y se consideran NEGATIVAS para HBeAg.

5.8.2a) Las muestras con una absorbancia mayor de (1,1 x Valor de Corte) se consideran como REACTIVAS y se consideran POSITIVAS para HBeAg.

5.8.3a) Las muestras con absorbancias dentro del Rango de Repetición (Valor de Corte $\pm 10\%$) deben ser repetidas en duplicado e interpretadas como se ha descrito.

Muestras con resultados de la repetición dentro del rango de repetición se informan como "indeterminadas". Se sugiere que las muestras con resultados "indeterminados" sean analizadas de nuevo.

(B) Detección de Anti-HBe

5.8.1b) Las muestras con absorbancias mayor de (1,1 x Valor de Corte) menores de (0,9 x Valor de Corte) se consideran como NO-REACTIVAS y se consideran NEGATIVAS para anti-HBe.

5.8.2b) Las muestras con una absorbancia menores de (0,9 x Valor de Corte) se consideran como REACTIVAS y se consideran POSITIVAS para anti-HBe.

5.8.3b) Las muestras con absorbancias dentro del Rango de Repetición (Valor de Corte $\pm 10\%$) deben ser repetidas en duplicado e interpretadas como se ha descrito.

Muestras con resultados de la repetición dentro del rango de repetición se informan como "indeterminadas". Se sugiere que las muestras con resultados "indeterminados" sean analizadas de nuevo.

5.9) Solución de Problemas

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

5.9.1) Procedimiento de lavado inadecuado.

5.9.2) Muestra contaminada con positivo.

5.9.3) Volumen de muestra, conjugado o sustrato equivocado.

5.9.4) Contaminación del borde del pocillo con conjugado.

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

5.9.6) Tiempo o temperatura de incubación equivocados.

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

5.9.8) Aspiración insuficiente.

5.10) Limitaciones e Interferencias

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

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

5.10.3) Resultados falsos positivos no reproducibles pueden producirse en cualquier kit de inmunoensayo enzimático, principalmente debido a error técnico ya sea de parte del operador o funcionamiento defectuoso del aparato usado.

5.10.4) Ocasionalmente se pueden obtener resultados reactivos falsos en forma reiterada ($\leq 2\%$).

5.10.5) Un resultado Anti-HBe o HBeAg negativo sin más evidencia no descarta la posibilidad de una infección previa por el virus de la hepatitis B.

5.10.6) Un resultado positivo (bajo) en HBeAg / anti-HBe ELISA no es prueba de protección y como tal no debe ser utilizado para excluir una infección por virus de la hepatitis B.

5.10.7) Es posible que las muestras positivas para Anti-HBe no siempre muestren propiedades lineales al hacer diluciones seriadas como ocurre en la dilución de material estándar.

5.10.8) Sustancias que podrían interferir:

Los siguientes resultados se obtuvieron en los respectivos experimentos:

1. No se ha observado interferencia con diferentes anticoagulantes tales como heparina con litio, K-EDTA, citrato de sodio.
2. Muestras que han sido tratadas con calor (+60°C, 10 horas) resultaron con títulos de HBsAg disminuidos.
3. No se detectó reacción cruzada al usar muestras de pacientes con otras infecciones VHA, VEB, CMV, VHS I, VHS II, Rubeola, Toxoplasmosis, VHC, VHI, anti-HBe(+), aHBe(+).
4. Las muestras que contienen sustancias que podrían interferir [Por ej. Suero, anticoagulantes EDTA, Citrato, heparina y muestras lipémicas hemolizadas o ictericas con anticuerpos monoclonales o autoinmunes altos, no interfieren con el resultado del ensayo] y las muestras de mujeres embarazadas no interfirieron con el ensayo Elisa HBeAg/Anti-HBe.

5.11) Características del Ensayo

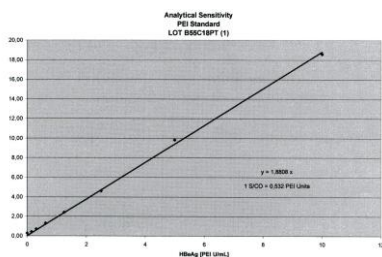
5.11.1) Ensayo HBeAg

5.11.1.1) Especificidad Analítica

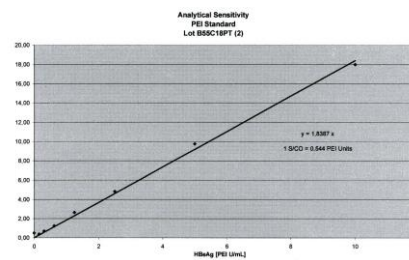
Reforzando el experimento con material HBsAg realizado en muestras emparejadas de suero y plasma no reactivos, en los tres anticoagulantes, para demostrar equivalencia en los resultados de los experimentos entre suero y diferentes tipos de plasma en el ensayo Elisa HBeAg/Anti-HBe. Las muestras lipémicas, hemolíticas, ictericas, con monoclonales altos y niveles de anticuerpos autoinmunes elevados no interfieren con el resultado del ensayo. El embarazo no influencia el resultado del ensayo para HBsAg. No se observaron resultados falsos positivos en muestras con estas características.

5.11.1.2) Sensibilidad Analítica

1a)

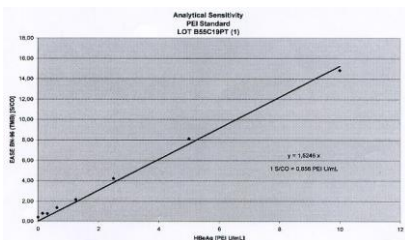


1b)

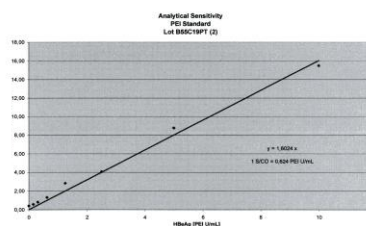


Las figuras 1a y b muestran dos diluciones seriadas del estándar HBeAg de PEI lote B55C18PT. La sensibilidad analítica calculada fue de 0,532 y 0,544 PEI Unidades/mL.

2a)



2b)



Las figuras 2a y b muestran dos diluciones en serie del estándar HBeAg de PEI lote B55C19PT. La sensibilidad analítica calculada fue de 0,656 y 0,624 PEI Unidades/mL.

Para HBeAg los valores determinados fueron 0,532; 0,544; 0,656; 0,624:

El promedio para la sensibilidad de HBeAg sería **0,59 PEI unidades/mL ± 0,06**

5.11.1.3) Exceso de Anticuerpo/Dosis alta Efecto de Gancho

Para analizar el efecto gancho por dosis alta/exceso de antígeno, un suero al que se le agregó HBeAg a una concentración de 10.000 PEI U/mL, fue analizado con los dos de los lotes evaluados de Elisa HBeAg/Anti-HBe de DIAsource. No se detectó el efecto gancho por dosis alta con ninguno de los dos lotes.

5.11.1.4) Especificidad Diagnostica

Resultados de la Evaluación Europea del Desempeño del HBeAg / ANTI-HBe ELISA de DIAsource – La Reactividad del “Donante” Negativo para VHB y Muestras “Clínicas”.

Muestra Negativa para HBeAg	DIAsource	Abbott
Pacientes hospitalizados	111	112
Muestras con posible interferencia	98	100
Total	209	212

Especificidad Diagnostica = $111 / 112 = 99.11 \%$

La especificidad del ensayo para la población clínica es 99,11%.

5.11.1.5) Sensibilidad Diagnóstica

5.11.1.5.1) Individuos infectados con VHB

1. La sensibilidad diagnóstica determinada por las evaluaciones Europeas de desempeño produjo los siguientes resultados:

Muestra	No. De muestras	Reactivas	Sensibilidad
Suero positivo para HBeAg	200	197	98.5%

Sensibilidad Diagnóstica = $197/200 = 98.5\%$

5.11.1.5.2) Paneles de seroconversión Comerciales

Se usaron dos paneles VHB de seroconversión Profile Diagnostics RP-016 y RP-009, disponibles en el comercio, consistentes en muestras de 2 pacientes con hepatitis B aguda a los que se les tomaron muestras de seguimiento semanalmente o mensualmente. Todos los paneles han sido caracterizados para marcadores serológicos específicos para VHB (HBeAg, Anti-HBe, anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc-IgM, y HBsAg).

Panel-ID	HBeAg / ANTI-HBe ELISA	Abbott AxSym	Diferencia
PD RP-016	2 muestras positivas (días 57 y 60)	2 muestras positivas (días 57 y 60)	Sin diferencia
PD RP-009	7 muestras positivas, 1 muestra en zona gris (días 13 (GZ), 29, 31,36, 53, 56, 69, 81)	9 muestras positivas, (días 11, 13, 29, 31,36, 53, 56, 69, 81)	Abbott Axsym fue reactivo 2 muestras antes o 2 días antes.

Resumen de la evaluación de todos los Paneles de Seroconversión analizados:

El Panel RP-016 produce resultados idénticos en cambio en el panel RP-009 Abbott Axsym detecta la primera muestra positiva el día 11 y Elisa HBeAg/Anti-HBe da un resultado en la zona gris el día 13. Esta diferencia no es importante en el diagnóstico de rutina ya que HBeAg es sólo un parámetro de seguimiento en el diagnóstico de la hepatitis B y no un parámetro que se busque detectar.

5.11.1.6) Evaluación de la Precisión

5.11.1.6.1) Exactitud: repetibilidad intra-ensayo y reproducibilidad entre-ensayo

Se usaron el control positivo del ensayo Elisa HBeAg/Anti-HBe 44,0 PEI U/ml y una muestra de suero con niveles de HBeAg justo sobre el corte y a nivel medio. Los resultados fueron usados para calcular la repetibilidad intra-ensayos y la reproducibilidad entre-ensayos como se muestra en las siguientes tablas.

Ítem analizado		Tamaño de la muestra	Resultado del ensayo	Rango de aceptación
control positivo	intra-ensayo	N = 22	2.12%	CV de IC* \leq 15%
		N = 22	2.42%	
		N = 22	3.15%	
	entre-ensayo	N = 66	2.76%	CV de IC* \leq 25%

PC/4	intra-ensayo	N = 36	4.90%	CV de IC* ≤ 25%
		N = 36	4.42%	
		N = 36	5.68%	
	entre-ensayo	N = 108	5.28%	CV de IC* ≤ 30%

* IC = índice de corte (idéntico al M/IC)

5.11.1.7) Seguimiento

El Calibrador Maestro del Elisa HBeAg/Anti-HBe de DIAsource ha sido calibrado contra el estándar HBeAg de PEI usando el ensayo Elisa HBeAg/Anti-HBe. La potencia relativa (razón) del estándar para HBeAg del Paul Ehrlich Institute (PEI) versus el Calibrador Maestro HBeAg de DIAsource es 1,187 (1,102-1,281 Intervalo de Confianza 95%). La concentración del Control positivo del ensayo ELISA HBeAg / Anti-HBe ha sido determinada usando el Calibrador Maestro HBeAg de DIAsource y fue establecida en 44,0 PEI U/ml.

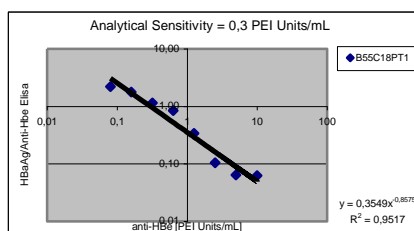
5.11.2) Ensayo Anti-HBe

5.11.2.1) Especificidad Analítica

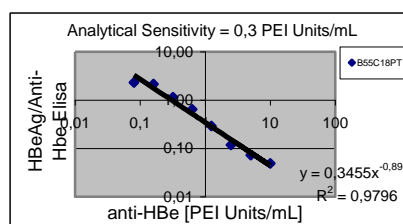
Reforzando el experimento con material anti-HBe realizado en muestras emparejadas de suero y plasma no reactivos, en los tres anticoagulantes, para demostrar equivalencia en los resultados de los experimentos entre suero y diferentes tipos de plasma en el ensayo Elisa HBeAg/Anti-HBe. Las muestras lipémicas, hemolíticas, ictericas, con monoclonales altos y niveles de anticuerpos autoinmunes elevados no interfieren con el resultado del ensayo. El embarazo no influencia el resultado del ensayo para anti-HBe. No se observaron resultados falsos positivos en muestras con estas características.

5.11.2.2) Sensibilidad Analítica

1a)

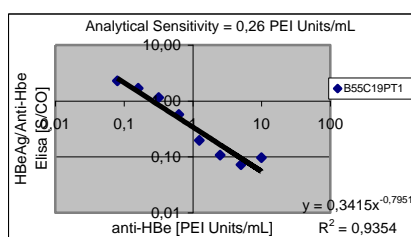


1b)

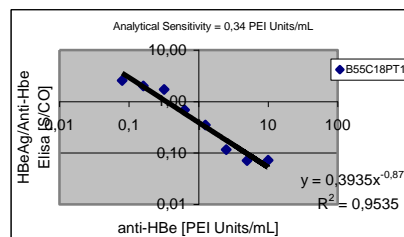


Las figuras 1a y b muestran dos diluciones seriadas del estándar anti-HBe de PEI lote B55C18PT. La sensibilidad analítica calculada fue de 0,30 PEI Unidades/mL.

2a)



2b)



Las figuras 2a y b muestran dos diluciones en serie del estándar anti-HBe de PEI lote B55C19PT. La sensibilidad analítica calculada fue de 0,30 PEI Unidades/mL.

Para anti-HBe los valores determinados fueron 0,30; 0,30; 0,26; 0,34:

El promedio para la sensibilidad de anti-HBe sería **0,3 PEI unidades/mL ± 0,033**

5.11.2.3) Exceso de Anticuerpo/Dosis alta Efecto de Gancho

Debido al formato competitivo del ensayo el efecto dosis alta –efecto de gancho, no puede ocurrir.

5.11.2.4) Especificidad Diagnóstica

Resultados de la Evaluación Europea del Desempeño del HBeAg / ANTI-HBe ELISA de DIAsource – La Reactividad del “Donante” Negativo para VHB y Muestras “Clínicas”.

Muestra Negativa para anti-HBe	DIAsource	Abbott
Muestras no seleccionadas	200	200
Pacientes hospitalizados	196	197

Especificidad Diagnóstica = $196 / 197 = 99.49\%$

La especificidad del ensayo para la población clínica es 99.49%.

5.11.2.5) Sensibilidad Diagnóstica

5.11.2.5.1) Individuos infectados con VHB

1. La sensibilidad diagnóstica determinada por las evaluaciones Europeas de desempeño produjo los siguientes resultados:

Muestra	No. De muestras	Reactivas	Sensibilidad
Suero positivo para anti-HBe	201	199	99.0%

Sensibilidad Diagnóstica = $199 / 201 = 99.0\%$

5.11.2.5.2) Paneles de seroconversión Comerciales

Se usaron dos paneles VHB de seroconversión Profile Diagnostics RP-016 y RP-009, disponibles en el comercio, consistentes en muestras de 2 pacientes con hepatitis B aguda a los que se les tomaron muestras de seguimiento semanalmente o mensualmente. Todos los paneles han sido caracterizados para marcadores serológicos específicos para VHB (HBeAg, Anti-HBe, anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc-IgM, y HBsAg).

Panel-ID	HBeAg / ANTI-HBe ELISA	Abbott AxSym	Diferencia
RP-016	8 muestras positivas (días 107, 109, 114, 116, 121, 123, 128, 157)	10 muestras positivas (días 81, 88, 107, 109, 114, 116, 121, 123, 128, 157)	Abbott AxSym fue reactivo 2 muestras antes o 26 días antes.
RP-009	7 muestras positivas (días 88, 98, 109, 123, 133, 166, 186)	9 muestras positivas, (días 88, 98, 109, 123, 133, 152, 166, 186, 202)	Abbott AxSym fue reactivo con dos muestras más los días 152 y 186

Resumen de la evaluación de todos los Paneles de Seroconversión analizados:

Panel RP-016 muestra una diferencia de dos muestras en la detección de la seroconversión de Anti-HBe donde en el panel RP-009 Abbott AxSym detectó la primera muestra positiva y el HBeAg/ Anti-HBe detectó la seroconversión en la misma muestra pero Abbott AxSym es reactivo en dos muestras más. Esta diferencia no es importante en el diagnóstico de rutina ya que HBeAg es sólo un parámetro de seguimiento en el diagnóstico de la hepatitis B y no un parámetro que se busque detectar.

5.11.2.6) Evaluación de la Precisión

5.11.2.6.1) Exactitud: repetibilidad intra-ensayo y reproducibilidad entre-ensayo

Se usaron el control negativo del ensayo HBeAg/ Anti-HBe y una muestra de suero con el nivel de Anti-HBe justo sobre el corte y a nivel medio. Los resultados fueron usados para calcular la repetibilidad intra-ensayo y la reproducibilidad entre-ensayos como se muestra en las siguientes tablas.

Ítem analizado		Número de muestras	Resultado del ensayo	Rango de aceptación
control negativo	intra-ensayo	N = 36	3.71%	CV de IC* \leq 15%
		N = 36	3.39%	
		N = 36	4.03%	
	entre-ensayo	N = 108	2.78%	CV de IC* \leq 15%
PC/20	intra-ensayo	N = 36	7.40%	CV de IC* \leq 25%
		N = 36	7.51%	
		N = 36	7.15%	
	entre-ensayo	N = 108	5.51%	CV de IC* \leq 25%

* IC = índice de corte (idéntico al M/corte)

5.11.2.7) Seguimiento

El Calibrador Maestro Anti-HBe de DIASource ha sido calibrado contra el estándar para Anti-HBe del PEI usando el ensayo HBeAg/ Anti-HBe. La potencia relativa (razón) del estándar del Paul Ehrlich Institute (PEI) para Anti-HBe versus el Calibrador Maestro Anti-HBe de DIASource es 1,115 (1,068-1,162 Intervalo de Confianza 95%). La concentración del Control Positivo del ensayo ELISA HBeAg / Anti-HBe ha sido determinada usando el Calibrador Maestro Anti-HBe de DIASource y ha sido establecida en 9,0 PEI U/ml.

5.12) Diagrama de Flujo del Procedimiento del Ensayo

El procedimiento simplificado es solo para usuarios experimentados. Se recomienda a los usuarios nuevos leer y seguir el procedimiento detallado del ensayo cuidadosamente.

PROCEDIMIENTO del

ENSAYO HBeAg

Incube a: 37° C, 1hr.

37° C, 1hr.

Agregue 100 µl de controles (3 x CN, 2 x CP) y
Agregue 100 µl de cada muestra en los pocillos.
Reserve 1 pocillo para el blanco.



Incube a +37 ±1 °C por 1 hora



Lave la placa.



Agregue 100 µl de Solución de Anti-HBe Peroxidasa en cada pocillo, excepto en el del blanco.



POCEDIMIENTO del ENSAYO

Anti-HBe

Incube a: 37° C, 1 hr.

37° C, 1 hr.

Agregue 50 µl de controles (3 x CN, 2 x CP) y
Agregue 50 µl de cada muestra en los pocillos.
Agregue 50 µl de Solución Neutralizante a cada pocillo. Reserve 1 pocillo para el blanco.



Incube a +37 ±1 °C por 1 hora

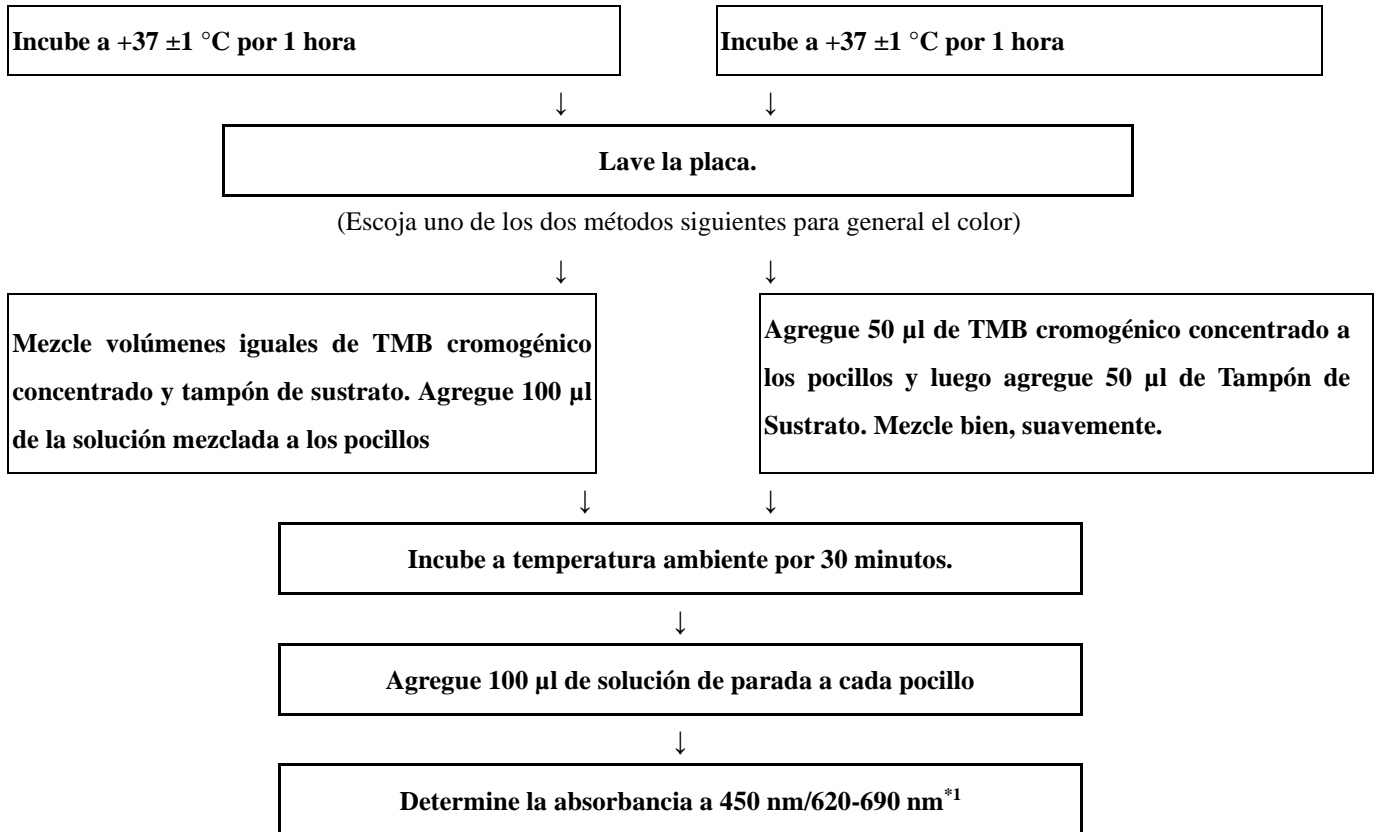


Lave la placa.



Agregue 100 µl de Solución de Anti-HBe Peroxidasa en cada pocillo, excepto en el del blanco.





6) BIBLIOGRAFIA

2 Inactivación incompleta del virus de la hepatitis B después de tratamiento con calor a +60°C por 10 horas, J. Infect. Dis. 138:242-244.

Notas:

*1 La longitud de onda de referencia del espectrofotómetro puede ser de 620nm a 690nm. Sin embargo el usuario debe validar el foto metro en conjunto con este kit antes de su uso.

Fecha de la revisión: 2019-10-24