

HBsAg

Antígeno de superfície da hepatite B (CLIA)

Informações do pedido

Número de catálogo	Tamanho de embalagem
HBsAg111	2 ×50 testes
HBsAg112	2 ×100 testes

Uso pretendido

O ensaio de HBsAg da série CL é um Imunoensaio quimioluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) sérico ou plasmático humano.

Resumo

O antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) é uma lipoproteína glicosilada e um componente de envelope externo da partícula do vírus da hepatite B (HBV). O HBsAg existe em duas formas no sangue de pessoas infectadas com HBV: uma apresenta-se como uma proteína capsídea ao redor de partículas de HBV; a outra forma são partículas em forma de tubo ou esfera (~22 nm) circulantes no sangue e não são infecciosas.¹ O fator determinante "a" de HBsAg é o principal alvo para ensaio imunológico e existe em todos os antígenos HBs. A heterogeneidade de HBsAg é proveniente de dois pares de determinantes mutuamente exclusivos: d/y e w/r, resultando em quatro subtipos principais: adw, ayw, adr e ayr.²

O HBsAg é o primeiro marcador sorológico para infecção por HBV, que pode ser detectada de 2 a 12 semanas após a infecção por HBV. É estável por vários dias a semanas antes de outros sintomas clínicos aparecem.³ O ensaio de HBsAg é usado como auxiliar no diagnóstico da infecção por HBV ou para verificar o status de infecção por HBV. Além disso, o ensaio de HBsAg pode ser usado para monitorar a eficácia de terapia anti-HBV ⁴.

Princípios do ensaio

O ensaio de HBsAg da série CL é um ensaio sanduíche de dois centros para determinar o nível de antígeno de superfície da hepatite B.

Na primeira etapa, a amostra, micropartículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina e biotina identificada como anticorpos monoclonais anti-HBs (IgG e IgA de camundongo) são condicionados em um frasco de reação. Após a incubação, micropartículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina ligam-se à biotina identificada como anticorpos monoclonais anti-HBs; o HBsAg presente na amostra liga-se à biotina identificada como anticorpos monoclonais anti-HBs. Um complexo composto de micropartículas paramagnéticas-estreptavidina-biotina identificada como anticorpo monoclonal anti-HBs-HBsAg é formado. As micropartículas paramagnéticas são capturadas magneticamente, enquanto outras substâncias não vinculadas são removidas por lavagem.

Na segunda etapa, o conjugado de anticorpo monoclonal anti-HBs (IgG de camundongo)-fosfatase

alcalina (ALP) é adicionado ao frasco de reação. Após a incubação, o conjugado de anticorpo monoclonal anti-HBs-ALP se liga ao HBsAg do complexo capturado pelas micropartículas paramagnéticas. O HBsAg liga-se à biotina identificada como anticorpo monoclonal anti-HBs e ao conjugado de anticorpo monoclonal anti-HBs-ALP para formar um sanduíche. As micropartículas paramagnéticas são capturadas magneticamente, enquanto outras substâncias não vinculadas são removidas por lavagem.

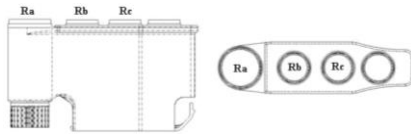
Na terceira etapa, a solução do substrato é adicionada ao frasco de reação. Ela é catalisada pelo conjugado de anticorpo anti-HBs-ALP no imunocomplexo retido nas micropartículas. A reação de quimioluminescência resultante é medida como unidades de luz relativas (RLUs) por um fotomultiplicador integrado no sistema. A quantidade de HBsAg presente na amostra é proporcional nas unidades de luz relativas (RLUs) geradas durante a reação. A concentração de HBsAg pode ser determinada por meio de uma curva de calibração, que é construída sobre uma curva de calibração principal codificada e três calibradores no nível do produto.

Componentes reagentes

O kit de reagentes é composto por três componentes: Ra, Rb e Rc. O componente não pode ser trocado, e as informações detalhadas de cada componente são listadas abaixo:

Ra	Micropartículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina no tampão de citrato com conservante.
Rb	Fosfatase alcalina identificada como anticorpo monoclonal anti-HBs (IgG do camundongo) no tampão MES com conservante.
Rc	Biotina identificada como anticorpos monoclonais anti-HBs (IgG e IgA de camundongo) em tampão TRIS com conservante.

A posição de cada componente é mostrada na figura abaixo (vista frontal à esquerda e vista superior à direita):



Estabilidade de armazenamento

O kit de reagente HBsAg (CLIA) fechado fica estável até a data de vencimento indicada no rótulo quando armazenado em temperaturas entre 2 °C e 8 °C. A data de validade real é indicada no rótulo.

O kit de reagente HBsAg (CLIA) pode ser armazenado onboard a temperaturas entre 2 °C e 8 °C e usado por no máximo 28 dias após a abertura.

Preparação do reagente

Ra: Pronto para usar

Rb: Pronto para usar

Rc: Pronto para usar

Materiais necessários, mas não fornecidos

Analizador de Imunoensaio Quimioluminescente da série CL da Mindray

Cat. Nº HBsAg211: Calibradores de HBsAg, 1 × 2,0 mL para cada nível de calibrador C0, C1 e C2

Cat. Nº HBsAgN311: Controle negativo HBsAg, 3×2,0 mL

Cat. Nº HBsAgN312: Controle negativo HBsAg, 6×2,0 mL

Cat. Nº HBsAgP311: Controle positivo HBsAg, 3×2,0 mL

Cat. Nº HBsAgP312: Controle positivo HBsAg, 6×2,0 mL

Cat. Nº CS511: Solução de substrato, 4 × 115 mL

Cat. Nº WB411: Tampão de lavagem, 1 × 10 L

Frasco de reação

Sistema do equipamento

Analizador de Imunoensaio Quimioluminescente da série CL da Mindray

Coleta e preparação do espécime

O soro humano é recomendável para o teste. Centrifugue as amostras a 3.500 rpm por no mínimo 10 minutos após a formação do coágulo ser concluída. As amostras devem ser testadas assim que possível após a coleta da amostra e o tratamento pré-analítico. Se possível, teste as amostras dentro de duas horas após a centrifugação ou transfira o sobrenadante para tubos para armazenamento. Se os testes não forem concluídos em 6 horas, as amostras deverão ser fechados e refrigerados a 2-8°C. Se os testes forem ser atrasados por mais de 14 dias, as amostras deverão ser congeladas a -20°C ou abaixo.

Evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, que podem deteriorar a amostra. A amostra pode ser usada depois de, no máximo, cinco ciclos de congelamento e descongelamento.

Não use a amostra com as seguintes condições:

- Inativada por calor
- Maciçamente hemolisada
- Com contaminação microbiana evidente
- Com fibrina ou outros resíduos celulares visíveis

Procedimento do ensaio

Para obter o procedimento de ensaio ideal, os operadores devem ler o manual de operação do sistema relacionado com atenção, para obter informações suficientes, como instruções de operação, preservação e administração da amostra, precauções de segurança e manutenção. Prepare todos os materiais necessários para o ensaio também.

Antes de carregar o kit de reagentes de HBsAg no instrumento pela primeira vez, inverta o frasco fechado do reagente suavemente por pelo menos 30 vezes para ressuspensão das micropartículas, que se acomodaram durante a remessa ou armazenamento. Inspeccione visualmente o frasco para assegurar que as micropartículas estão homogeneizadas. Se as micropartículas permanecerem coladas no frasco, continue invertendo até que elas sejam totalmente ressuspensas. Se não for possível homogeneizar as

micropartículas de novo, é recomendável não usar esse frasco de reagente. Entre em contato com o Serviço de Atendimento da Mindray para obter ajuda. Não inverta os frascos do reagente abertos.

Este ensaio requer 50 µL de volume de amostra para um único teste. Esse volume não inclui o volume morto do contêiner da amostra. Um volume adicional é necessário ao realizar mais testes da mesma amostra. Os operadores devem consultar o manual de operação do sistema e o requisito específico do ensaio para determinar o volume mínimo da amostra.

Calibração

O ensaio de HBsAg série CL (CLIA) da Mindray foi calibrado de acordo com o segundo Padrão Internacional de HBsAg da OMS (subtipo adw2, genótipo A, código NIBSC: 00/588).

As informações específicas do kit de reagente da curva de calibração principal de HBsAg (CLIA) são armazenadas no código de barras bidimensional colado no pacote do reagente. Ele é usado com os calibradores do produto para a calibração do lote do reagente específico. Ao realizar a calibração, verifique as informações da curva de calibração principal do código de barras no sistema primeiro, e depois use os calibradores em três níveis. A curva de calibração válida é necessária antes de qualquer teste de HBsAg ser realizado. A recalibração é recomendável a cada 4 semanas ou quando um novo lote de reagente é usado, ou os controles de qualidade estão fora do intervalo especificado. Para obter instruções detalhadas de calibração, consulte o manual de operação do sistema.

Controle de qualidade

Recomenda-se que os controles de qualidade sejam executados uma vez a cada 24 horas, se os testes estiverem em uso, ou após cada calibração. A frequência de controle de qualidade deve ser adaptada aos requisitos individuais de cada laboratório. Os dois níveis de controles de qualidade recomendados para este ensaio são Controle negativo HBsAg e Controle positivo HBsAg da Mindray.

Os resultados do controle de qualidade devem estar dentro dos intervalos aceitáveis. Se um controle estiver fora do intervalo especificado, os resultados do teste associado serão inválidos e as amostras precisarão ser retestadas. Talvez seja necessário recalibrar. Consulte o manual de operação do sistema para verificar o sistema de ensaio. Se os resultados do controle de qualidade ainda estiverem fora do intervalo especificado, entre em contato com o Serviço de Atendimento da Mindray para obter ajuda.

Cálculo

O analisador calcula automaticamente a concentração de analito de cada amostra com base na curva de calibração principal do código de barras, e um Ajuste da curva logística de 4 parâmetros (4PLC) com as unidades de luz relativas (RLUs) geradas dos calibradores do produto em três níveis das concentrações definidas. Os resultados são mostrados na unidade de IU/mL.

Diluição

Amostras com concentrações de HBsAg acima do limite superior podem ser diluídas com o Diluente da Amostra da Mindray. A diluição recomendada é 1:40 (realizada manualmente ou automaticamente pelo analisador). A concentração da amostra diluída deve ser > 0,10 IU/mL. Após a diluição manual, multiplique o resultado pelo fator de diluição. Após a diluição automática realizada pelo analisador, o sistema multiplica automaticamente o resultado pelo fator de diluição ao calcular a concentração da amostra.

Faixa de referência

Dois tipos de kits de ensaio de HBsAg reconhecidos foram utilizados para selecionar 517 amostras de HBsAg não reativas e 240 amostras de HBsAg reativas. Essas amostras foram testadas pelo kit de HBsAg no sistema Mindray CL-2000i. Os dados foram analisados com o software de análise estatística (curva ROC). A especificidade e a sensibilidade podem variar de acordo com o valor de corte selecionado. Um ponto de corte de 0,05 IU/mL com a melhor especificidade e sensibilidade equilibradas foi determinado como o ponto de corte do kit de HBsAg da Mindray.

As amostras testadas com o kit de HBsAg no sistema Mindray CL2000i com uma concentração inferior ao ponto de corte (0,05 IU/mL) são consideradas reativas para HBsAg; com uma concentração maior que ou igual ao ponto de corte, são consideradas não reativas para HBsAg.

Interpretação dos resultados

- As amostras com concentração de HBsAg <0,05 IU/mL são não reativas no ensaio de HBsAg da Mindray e são consideradas como negativas para a infecção por HBV. Essas amostras não precisam de mais testes.
- As amostras com concentração de HBsAg ≥0,05 IU/mL são consideradas como inicialmente reativas.
- Todas as amostras inicialmente reativas com HBsAg <1,00 IU/mL devem ser transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas a ≥10.000 RCF (força centrífuga relativa) por 10 minutos e, em seguida, testadas em duplicata.

Se ambos os resultados forem inferiores a 0,05 IU/mL, a amostra é não reativa; não há necessidade de mais teste para o paciente. Se algum dos resultados de reteste for maior do que 0,05 IU/mL, a amostra será várias vezes reativas, e o paciente será considerado positivo para a infecção por HBV.

As amostras várias vezes reativas, bem como as amostras inicialmente reativas com concentração ≥1,00 IU/mL devem ser confirmadas de acordo com os algoritmos confirmatórios recomendados.

Limitação de medida

O limite superior do intervalo de detecção deste ensaio é de 250 IU/mL. Uma amostra com concentração de HBsAg menor que o limite superior pode ser quantitativamente determinado, enquanto a amostra com uma concentração mais alta do que o limite superior será relatado como >250 IU/mL ou diluindo a amostra com o Diluente de amostra da Mindray.

A concentração de HBsAg em um dado espécime pode variar de acordo com o sistema de medição

dos fabricantes, devido às diferenças nos métodos do ensaio, calibração e especificidade do reagente. Os resultados do ensaio devem ser usados em conjunto com outros dados, como sintomas, resultados de outros testes, histórico clínico etc. para tomar decisões clínicas.

Características de desempenho

Sensibilidade.

O ensaio de HBsAg da Mindray (CLIA) tem uma sensibilidade analítica de ≤ 0,05 IU/mL. A sensibilidade analítica é definida como a mais baixa concentração de analito que pode ser diferenciada de uma amostra que não contém analitos. Ela é medida como a concentração de HBsAg em dois desvios-padrão acima da média de RLU de 20 medições de uma amostra sem analito.

Sensibilidade diagnóstica

400 amostras foram consideradas positivas para HBsAg por métodos de referência. O kit de HBsAg no sistema Mindray CL-2000i detecta 400 amostras como positivas. A taxa de coincidência positiva é de 100,00%.

Intervalo para relatório

O intervalo para relatório é definido pela sensibilidade analítica do ensaio e o limite superior da curva de calibração principal. A faixa de relato do ensaio de HBsAg da Mindray (CLIA) é 0,05~250 IU/mL (ou o limite superior é de até 10.000 IU/mL para amostras diluídas 40 vezes).

Precisão

O ensaio de HBsAg da série CL foi projetado para ter uma precisão de ≤10% (dentro do CV do dispositivo). A precisão foi determinada de acordo com o Comitê Nacional para Normas de Laboratórios Clínicos (NCCLS), Protocolo EP5-A2². Dois níveis de controles de qualidade foram testados em duplicata em duas execuções separadas por dia, em um total de 20 dias, usando um único lote de reagentes e uma única curva de calibração. Os dados de precisão estão resumidos na tabela abaixo.

Amostra	Média de HBsAg (IU/mL)	Dentro do CV da execução	Entre o CV da execução	Dentro do CV do dispositivo
Controle negativo	0,01	3,47%	7,21%	7,37%
Controle positivo	1,12	1,73%	4,14%	4,03%

Especificidade

Hemoglobina até 500 mg/dL, bilirrubina até 20 mg/dL, triglicerídeos até 2.800 mg/dL, proteína total até 10 g/dL, fator reumatoide (RF) até 1.500 IU/mL, anticorpo anti-DNA (ANA) até 2.000 U/L e Anticorpo humano anticomundongo (HAMA) não interferem no ensaio de HBsAg da série CL. Essas substâncias mostram menos de 10% de interferência nas concentrações indicadas.

O Kit de HBsAg da Mindray foi avaliado quanto a possível reação cruzada com substâncias em indivíduos com condições médicas não relacionadas à infecção por HBV. Pelo menos 5 amostras contendo cada um dos patógenos potencialmente interferentes

seguintes (HAV, HCV, HEV, HGV, HIV-1/2, TP, EBV, RV, CMV, HSV-1, Toxo Rubella, *E.coli*, Yeast e lentivírus) são testadas pelo kit de HBsAg da Mindray e um kit de reagente de referência. Todos os resultados são consistentes em ambos os sistemas.

1138 amostras foram consideradas negativas para HBsAg por métodos de referência. O ensaio de HBsAg da Mindray detectou 1133 amostras como negativas e 5 amostras como positivas. A taxa de coincidência negativa é de 99,60%.

Exatidão

Dois controles de veracidade com valores rastreáveis definidos de acordo com o padrão internacional foram usados para verificar a exatidão desse ensaio. Os resultados mostraram que o desvio relativo foi menor que ±10%. Os resultados estão listados na tabela a seguir.

Amostra	HBsAg medido (IU/mL)	HBsAg definido (IU/mL)	Desvio Relativo
Controle baixo	10,46	10,14	3,16%
Controle alto	95,07	92,37	2,92%

Linearidade

Uma amostra de HBsAg de alta concentração (aproximadamente 220 IU/mL) foi misturada com uma amostra de baixa concentração (<5 IU/mL) em proporções diferentes, gerando uma série de diluições. O total de HBsAg de cada diluição foi determinado com o uso do ensaio de HBsAg da série CL da Mindray. A linearidade foi demonstrada no intervalo de 5,00 IU/mL a 200,00 IU/mL, o coeficiente de correlação é ≥0.9900. Os dados de linearidade estão resumidos na tabela abaixo.

HBsAg (IU/mL)	1	2	3	4	5	6
Esperado	2,81	25,69	67,38	128,91	184,38	241,22
Medido	2,41	24,12	60,31	120,61	180,92	241,22

Comparação de métodos

O ensaio de HBsAg da série CL da Mindray foi comparado com um kit de diagnóstico comercialmente disponível em um estudo de correlação. Os dados estatísticos obtidos pelo modo de computação Deming são mostrados na tabela abaixo.

Intervalo de concentração (IU/mL)	Inclinação	Interceptação	Coefficiente de correlação
5-250	0,97	0,68	0,989

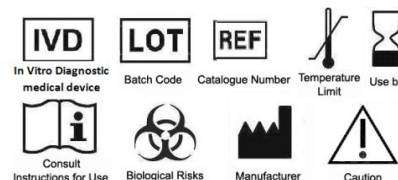
Avisos e precauções

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Siga todas as regras ao manusear reagentes de laboratório e adote as precauções de segurança necessárias.
- Devido às diferenças na metodologia e especificidade do anticorpo, os resultados de teste da mesma amostra podem ser diferentes durante o uso de kits de reagentes de fabricantes diferentes no sistema da Mindray ou com o uso de kits de reagentes da Mindray em outros sistemas.
- Não use kits de reagentes com a data de

expiração vencida.

- Não use reagentes misturados de lotes diferentes.
- Sempre mantenha o pacote de reagente na posição vertical para assegurar que nenhuma micropartícula seja perdida antes do uso.
- Não é recomendável usar o pacote de reagente aberto a mais de 28 dias.
- A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida se as instruções no encarte deste pacote não forem seguidas.
- Todos os resíduos de amostra e reação devem ser considerados potencialmente nocivos, e devem ser manuseados em conformidade com os regulamentos e diretrizes locais.
- A folha de dados de segurança de material (MSDS) está disponível mediante solicitação.

Símbolos Gráficos



Bibliografia

- Carman WF, Thomas HC. Genetic Variation in Hepatitis B Virus. *Gastroenterology* 1992; 102: 711-719.
- Khoury ME, et al. Hepatitis B: Epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 2004; 59: 216-224.
- Bernard W, Anja Bayer, et al. Improved Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen by a New Rapid Automated Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 2639-2647.
- Perrillo RP, Aach RD. The Clinical Course and Chronic Sequelae of Hepatitis B Virus Infection. *Seminars in Liver Disease* 1981; 80: 225-232.
- CLSI. EP5-A2: Vol. 24, No. 25, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Method; Approved Guideline – Second Edition.

© 2017 Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.

Todos os direitos reservados

Fabricante: Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.

Endereço: Mindray building, Keji 12th Road South, Hi-tech Industrial Park, Nanshan, Shenzhen, 518057 P.R.China

Endereço de e-mail: service@mindray.com.cn

Tel: +86-755-26582888

Fax: +86-755-26582680