



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN Nº

4721

BUENOS AIRES, 12 JUN 2015

VISTO el expediente Nº 1-47-9168/14-9 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

**CONSIDERANDO:**

Que por los presentes actuados la firma BIOARS S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico de uso "in vitro" denominados 1) HDV Ab (total antibody) / ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA) para la determinación de anticuerpos frente al virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos; 2) HDV Ag/ ensayo inmunoenzimático de tercera generación (ELISA) para la determinación del Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos; 3) HDV IgM / ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de la clase IgM frente al virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos .

Que a fojas 159 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley Nº 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición ANMAT Nº 2674/99.



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN Nº 7721

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos Nº 1490/92 y 1886/14.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE  
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos de los productos de diagnóstico para uso in Vitro denominados 1) HDV Ab (total antibody) / ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA) para la determinación de anticuerpos frente al virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos; 2) HDV Ag/ ensayo inmunoenzimático de tercera generación (ELISA) para la determinación del Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos; 3) HDV IgM / ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de la clase IgM frente al virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos, el que será elaborado por DIA.PRO Diagnostic Bioprobes S.r.l. Via G. Carducci, 27-20099- Sesto San Giovanni, Milan (ITALIA) e importado terminado por la firma BIOARS S.A., en envases conteniendo: 1) Envases por 60 determinaciones conteniendo: PapilloCheck® PCR MasterMix (5 x 300 µl), PapilloCheck® Slidebox (5 x 12 matrices), PapilloCheck® BUF A conc. (2 x 40 ml), PapilloCheck® BUF B conc. (1 x 15 ml) y PapilloCheck® Buffer de Hibridación (2 x 1000 µl); 2) Envases conteniendo 1) Mircoplaca (MICROPLACA); Control Negativo (CONTROL -: 2ml), Control Positivo (CONTROL +: 2 ml),



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN Nº

4721

Calibrador (CAL: liofilizado), tampón de lavado concentrado (WASHBUF 20X: 60ml), Enzima Conjugada (CONJ: 16ml); Cromógeno / Sustrato (SUBS TMB: 16ml) y Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3M: 15ml); 2) Mircoplaca (MICROPLACA), Control Negativo (CONTROL -: 2ml), Control Positivo (CONTROL +: 2 ml), Calibrador (CAL: liofilizado), tampón de lavado concentrado (WASHBUF 20X: 60ml), Enzima Conjugada (CONJ: 16ml), Cromógeno / Sustrato (SUBS TMB: 16ml), Diluyente de muestras (DILSPE: 16ml) y Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3M: 15ml); y 3) Mircoplaca (MICROPLACA), Control Negativo (CONTROL -: 2ml), Control Positivo (CONTROL +: 2 ml), Calibrador (CAL: liofilizado), tampón de lavado concentrado (WASHBUF 20X: 60ml), Enzima Conjugada (CONJ 20X: 0.8ml), Antígeno HDV (Ag HDV: 6 viales liofilizados), Diluyente de Antígeno HDV (Ag DIL: 16ml), Cromógeno / Sustrato (SUBS TMB: 16ml), Diluyente de muestras (DILSPE: 2 X 60ml) y Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3M: 15ml), con una vida útil de QUINCE (15) MESES desde la fecha de elaboración, conservados entre 2 y 8°C y que la composición se detalla a fojas 46 a 48 .

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 78 a 153 (Desglosándose fjs. 78, 81 a 83, 90 a 96, 110 a 118 y 135 a 142) debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N.M.A.T

DISPOSICIÓN Nº 4721

métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

EXPEDIENTE Nº 1-47-9168/14-9

DISPOSICIÓN Nº:

4721

Fd

  
Ing. ROGELIO LOPEZ  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.

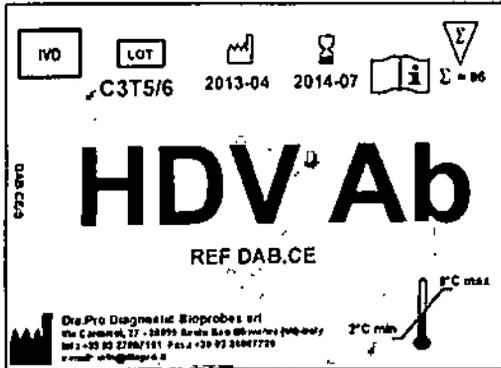


**PROYECTO DE ROTULADO: RÓTULOS EXTERNOS**

**PRODUCTO:**

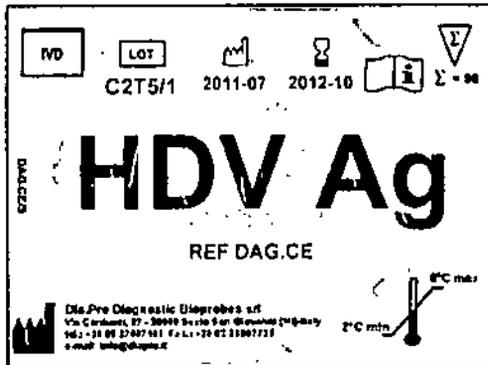
12 JUN 2015

a) HDV Ab



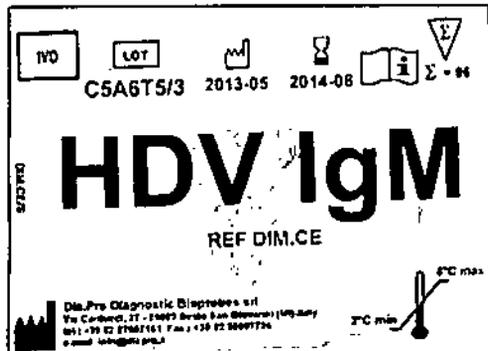
HDV Ab			
Reagents/Reagenti/Reactifs/Reagenzien/Reactivos/Reagentes			
MICROPLATE	n° 1		LOT
CONTROL -	n° 1	ml 2	
CONTROL +	n° 1	ml 2	C3T5/6
CAL ....	n° 1	lyoph.	
WASHBUF 20X	n° 1	ml 60	CE
CONJ	n° 1	ml 16	
SUBS TMB	n° 1	ml 16	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.3 M	n° 1	ml 15	
			0318

b) HDV Ag



HDV Ag			
Reagents/Reagenti/Reactifs/Reagenzien/Reactivos/Reagentes			
MICROPLATE	n° 1		LOT
CONTROL -	n° 1	ml 2	
CONTROL +	n° 1	ml 2	C2T5/1
CAL ....	n° 1	lyoph.	
WASHBUF 20X	n° 1	ml 60	CE
CONJ	n° 1	ml 16	
DILSPE	n° 1	ml 16	
SUBS TMB	n° 1	ml 16	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.3 M	n° 1	ml 15	0318

a) HDV IgM



HDV IgM			
Reagents/Reagenti/Reactifs/Reagenzien/Reactivos/Reagentes			
MICROPLATE	n° 1		LOT
CONTROL -	n° 1	ml 2	
CONTROL +	n° 1	ml 2	C5A6T5/3
CAL ....	n° 1	lyoph.	
WASHBUF 20X	n° 1	ml 60	CE
CONJ 20X	n° 1	ml 0.8	
Ag DIL	n° 1	ml 16	
Ag HDV	n° 6	lyoph.	
SUBS TMB	n° 1	ml 16	0318
DILSPE	n° 2	ml 60	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.3 M	n° 1	ml 15	

Establecimiento Elaborador: Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l. Via G. Carducci, n° 27, 20099, Sesto San Giovanni, Milán, Italia.  
 Establecimiento Importador BIOARS S.A. – Santo Domingo 2578/80 – C.A.B.A.  
 Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028  
 Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. Certificado N°

HDV Producto de Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl

*Claudia E. Etchevés*  
 BIOARS S.A.  
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES  
 DIRECTORA TÉCNICA



ORIGINAL

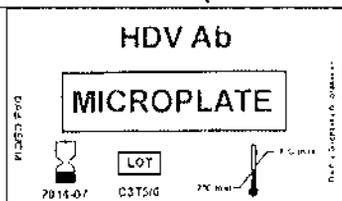
4721

# PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

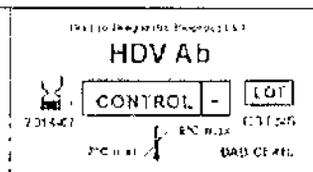
PRODUCTO:

a) HDV Ab

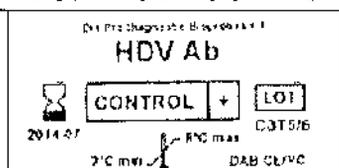
**MICROPLACA (96 TESTS)**



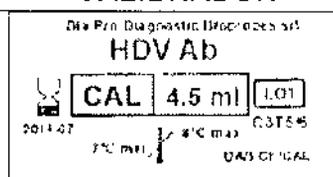
**CONTROL NEGATIVO**



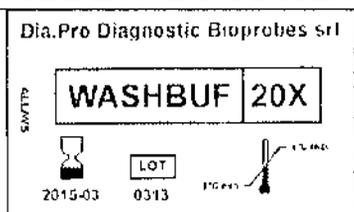
**CONTROL POSITIVO**



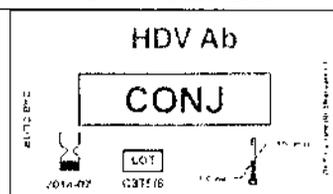
**CALIBRADOR**



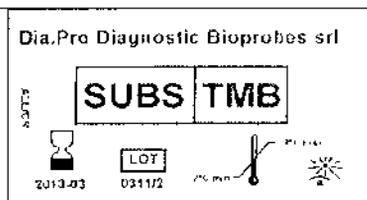
**TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO**



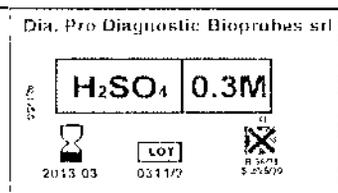
**CONJUGADO**



**CROMÓGENO/SUSTRATO**



**ÁCIDO SULFÚRICO**



b) HDV Ag

*[Signature]*  
BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES  
DIRECTOR TECNICO

4721



MICROPLACA (96 TESTS)

HDV Ag

MICROPLATE

2012-05 LOT C2T4/B

CONTROL NEGATIVO

HDV Ag

CONTROL -

2012-05 LOT C2T4/B

CONTROL POSITIVO

HDV Ag

CONTROL +

2012-05 LOT C2T4/B

CALIBRADOR

HDV Ag

CAL 1 ml

2012-05 LOT C2T4/B

TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO

WASHBUF 20X

2015-03 LOT 0313

CONJUGADO

HDV Ag

CONJ

2012-05 LOT C2T4/B

DILUYENTE DE MUESTRAS

HDV Ag

DILSPE

2012-05 LOT C2T4/B

CROMÓGENO/SUSTRATO

SUBS TMB

2010-03 LOT 0314/B

ÁCIDO SULFÚRICO

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M

2013-03 LOT 0311/B

c) HDV IgM

MICROPLACA (96 TESTS)

HDV IgM

MICROPLATE

2014-06 LOT C5A8T6/B

CONTROL NEGATIVO

HDV IgM

CONTROL -

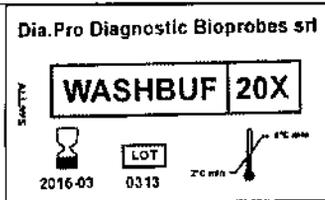
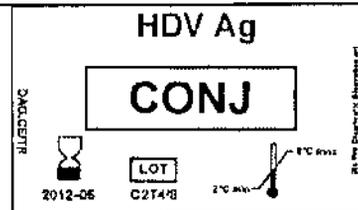
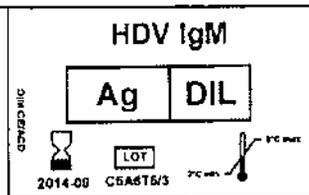
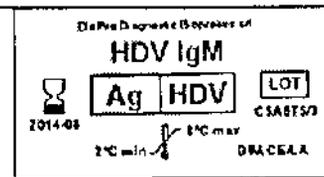
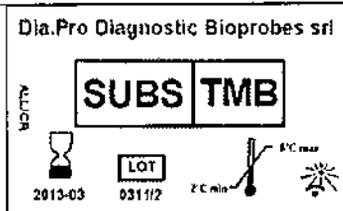
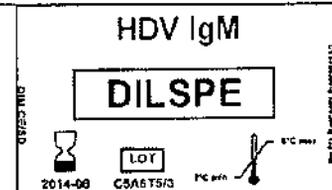
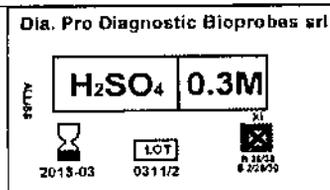
2014-06 LOT C5A8T6/B

HDV Producto de la Pr...

*Handwritten signature*

BIOARS S.A.  
BIOO CLAUDIA ETCHEVES  
DIRECTOR TECNICO

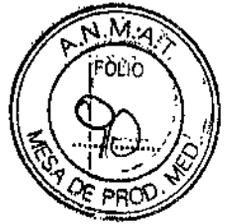
*Handwritten signature*

**CONTROL POSITIVO****CALIBRADOR****TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO****CONJUGADO 20X****DILUENTE DE ANTÍGENO HDV****ANTÍGENO HDV****CROMÓGENO/SUSTRATO****DILUENTE DE MUESTRAS****ÁCIDO SULFÚRICO**

Establecimiento Elaborador: Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l. Via G. Carducci, n° 27, 20099, Sesto San Giovanni, Milán, Italia.  
 Establecimiento Importador BIOARS S.A. - Santo Domingo 2578/80 - Capital Federal  
 Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028  
 Uso Profesional Exclusivo. Uso Profesional Exclusivo. Autorizado Certificado N°

HDV Producto de Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl

*Claudia Etchevés*  
 BIOARS S.A.  
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS  
 DIRECTOR TÉCNICO



# HDV Ab

**Ensayo inmunoenzimático competitivo  
para la determinación de anticuerpos  
frente al Virus de la Hepatitis Delta  
en plasma y suero humanos**

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"



## DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milán) - Italia

Telefono +39 02 27007161

Fax +39 02 26007726

e-mail [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF DAB.CE  
96 pruebas

*[Handwritten Signature]*  
BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVEZ  
DIRECTOR TÉCNICO

472



## HDV Ab

### A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA) para la determinación de anticuerpos frente al Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos con una metodología de "dos pasos".

El equipo ha sido desarrollado para el seguimiento de pacientes infectados con HDV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"

### B. INTRODUCCIÓN.

El Virus de la Hepatitis Delta es un virus ARN defectivo. Se compone de un núcleo con los antígenos delta específicos, y está encapsulado por el HBsAg. Para su replicación necesita ayuda funcional de HBV.

La infección por HDV ocurre en presencia de una infección aguda o crónica por HBV. Cuando se presenta simultáneamente la infección aguda por los dos virus, la enfermedad es grave y el cuadro clínico, así como las características bioquímicas son prácticamente indistinguibles de una infección por HBV. Sin embargo, una persona infectada por HBV de forma crónica puede soportar indefinidamente la replicación por HDV, normalmente la enfermedad es menos severa y aparece como exacerbación clínica.

La determinación de los marcadores serológicos específicos de HDV (HDV Ag, HDV Ab, HDV IgM y HDV IgG) representa una herramienta importante para los clínicos en la clasificación del agente etiológico, en el seguimiento de los pacientes así como en el tratamiento.

La detección de anticuerpos totales permite la clasificación de la enfermedad y el seguimiento de la seroconversión.

### C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El ensayo es de tipo competitivo, donde los anticuerpos anti-HDV de la muestra compiten con un anticuerpo policlonal (IgG) específico para el virus y conjugado con peroxidasa (HRP), por el antígeno recombinante-HDV de la fase sólida.

El ensayo se realiza mediante un sistema de dos pasos con incubación competitiva. La muestra se añade a la placa y los anticuerpos específicos anti-HDV se combinan con el antígeno de la fase sólida. Después del lavado, se añade un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa (HRP) que se une al antígeno libre en la placa. Previo lavado, se añade el sustrato cromogénico.

La concentración de la enzima conjugada, unida a la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos al HDV presentes en la muestra y su actividad se detecta por la adición del sustrato cromogénico.

La concentración de anticuerpos específicos al HDV en la muestra se determina de manera semicuantitativa a través del cálculo de un valor de corte.

### D. COMPONENTES.

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

#### 1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con antígeno recombinante específico de HDV, en bolsas selladas con desecante. Se deben poner las placas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

#### 2. Control Negativo: CONTROL

1x2.0ml/vial. Listo para el uso. Contiene proteínas del suero de cabra, tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4 +/-0.1, además de azida sódica 0.09% y Kathon GC 0.1% como conservantes. El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

#### 3. Control Positivo: CONTROL+

1x2.0ml/vial. Listo para el uso. Contiene proteínas del suero de cabra, alto título de anticuerpos anti-HDV, tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4 +/-0.1, además de azida sódica 0.09% y Kathon GC 0.1% como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde.

#### 4. Calibrador: CAL

n° 1 vial. Liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero bovino fetal, bajo título de anticuerpos humanos al HDV, además de sulfato de gentamicina 0.02 mg/ml y Kathon GC 0.1% como conservantes.

*Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco, varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.*

#### 5. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y Kathon GC al 1%.

#### 6. Conjugado: CONJ

1x16ml/vial. Solución lista para el uso. Contiene 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, anticuerpo policlonal anti-HDV conjugado con peroxidasa (HRP) en presencia de 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y Kathon GC 0.1% como conservante. El conjugado está codificado con el color rojo.

#### 7. Cromógeno/Sustrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

*Nota: Evitar la exposición a la luz, ya que la sustancia es fotosensible.*

#### 8. Ácido Sulfúrico: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M

1x15ml/vial. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M. Atención. Irritante (Xn R36/38, S2/26/30).

Sellador adhesivo, n°2

Manual de instrucciones, n°1

### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

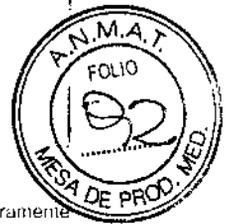
1. Micropipetas calibradas (10-1000 µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (Biodestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

### F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad.

BIOARS S.A.  
 BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES  
 DIRECTOR TÉCNICO

F



- según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces
  4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
  5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría
  6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos.
  7. Comprobar que los reactivos no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente.
  8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
  9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
  10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el equipo e internamente en los reactivos
  11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed 1984
  12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
  13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben de ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
  14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
  15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua
  16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio

**G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.**

1. Extraer la sangre asepticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica, ya que pudiera afectar la actividad enzimática del conjugado

3. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el pesquaje en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. Suero y plasma pueden conservarse hasta 5 días, a partir del momento de la extracción, a una temperatura entre 2 y 8°C. Para períodos de conservación más largos, las muestras deben almacenarse a -20°C, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

**H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.**

Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.

**1. Microplacas:**

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Atención al cliente

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde

**2. Control Negativo:**

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar

**3. Control Positivo.**

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar

**4. Calibrador:**

Añadir al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver totalmente y mezclar suavemente en el vórtex

*Note: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.*

**5. Solución de Lavado Concentrada:**

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada hasta 1200ml y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado

*Note: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C*

**6. Conjugado:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

**7. Cromógeno/ Sustrato:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes

*Claudia Etchevès*  
BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVÈS  
DIRECTOR TÉCNICO



químicos, polvo o microbios Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

#### 8. Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Atención: Irritante (Xi R36/38, S2/26/30)

Leyenda:

R 36/38 = Irritante a los ojos y la piel

S2/26/30 = En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y consultar un médico

#### I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

- Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (etanol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios) Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%
- La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA
- El lavador de ELISA es extremadamente importante para la realización del ensayo. Antes de emplearse en los ensayos de rutina del laboratorio, debe ser cuidadosamente optimizado y validado usando los controles/calibrador y paneles de referencia pertinentes Para asegurar que el ensayo se realiza conforme lo esperado, normalmente basta con 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350µl/pocillo de solución de lavado = 1 ciclo). Se recomienda un tiempo entre ciclos de 20-30 segundos. Para establecer correctamente el número de lavados se recomienda efectuar el ensayo con los controles/calibrador del equipo, el calibrador así como sueros positivos y negativos de referencia tratando de ajustarlos a los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo". La calibración periódica del volumen a dispensar (descontaminación y lavado de las agujas) debe hacerse según las instrucciones del fabricante.
- Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630nm, recomendado) para reducir interferencias en la lectura El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10nm b) Rango de absorbancia de 0 a >=2.0, c) Linealidad >=2.0, reproducibilidad >=1% El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo" El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y las de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por

contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo

- El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar, en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

#### L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

- Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario) No usar si ha caducado.
- Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no este rota o dañada.
- Diluir totalmente la solución de lavado 20x concentrada como se ha descrito anteriormente
- Disolver el Calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente usando un vortex
- Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante Fijar el número de ciclos de lavado de acuerdo a los parámetros de validación del instrumento para usar con el equipo.
- Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20 minutos antes de realizar la lectura
- En caso de trabajar automáticamente, conectar el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso
- En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable

#### M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

- Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco Almacenar las tiras restantes en la bolsa con el desecante a temperaturas entre 2 y 8°C
- Dispensar 100µl del Control Negativo, por triplicado, 100µl del Calibrador, por duplicado, y 100µl del Control Positivo Posteriormente, añadir 100µl de cada muestra. Comprobar que los controles/calibrador y muestras se han añadido correctamente. Después incubar la microplaca durante 60 minutos a +37°C.
- Lavar la microplaca según lo descrito previamente (sección I.3).
- Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1; comprobar que los reactivos se han añadido correctamente. Incubar la microplaca durante 60 minutos a +37°C.

**Nota importante** Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación

BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES  
DIRECTOR TÉCNICO

721



5. Lavar la microplaca según lo describió previamente (sección I.3)

6. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1  
Incubar la microplaca protegida de la luz a temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos

**Nota importante.** No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias

7. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 6. La adición de la solución de parada cambia el color del Control Negativo y las muestras negativas de azul a amarillo

8. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, recomendado), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco)

**Notas importantes:**

- Si no se puede utilizar el segundo filtro, asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer a 450nm. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

**N. ESQUEMA DEL ENSAYO**

Controles/Calibrador	100 µl
Muestras	100 µl
<b>1<sup>ra</sup> incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Lavado	4-5 ciclos
Conjugado	100 µl
<b>2<sup>da</sup> incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Lavado	4-5 ciclos
Mezcla TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl
<b>3<sup>ra</sup> incubación</b>	<b>20 min</b>
Temperatura	t.a.*
Acido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm & 620nm

t.a \* temperatura ambiente

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

	Microplaca											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A:	BL	M2										
B:	CN	M3										
C:	CN	M4										
D:	CN	M5										
E:	CAL	M6										
F:	CAL	M7										
G:	CP	M8										
H:	M1	M9										

Leyenda. BL = Blanco CN = Control Negativo  
CAL = Calibrador CP = Control Positivo M = Muestra

**O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO**

Se realiza un grupo de pruebas con los controles/calibrador cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores DO450nm o M/Co son los esperados

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	valor < 0.100 DO450nm
Control Negativo (CN)	> 1 000 DO450nm después de leer el blanco Si es menor, controle cuidadosamente el proceso de lavado y disminuya los ciclos o el tiempo entre los mismos Coeficiente de variación < 30%
Calibrador	CN/10 < DO450nm < CN/5
Control Positivo	DO450 nm < CN/10

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección

En caso contrario, no siga adelante y compruebe:

Problema	Compruebe que
<b>Pocillo blanco</b> > 0.100DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo
<b>Control Negativo (CN)</b> < 1.000DO450nm después de leer el blanco  Coeficiente de variación > 20%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo) 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
<b>Calibrador</b> DO450nm Fuera de rango	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador
<b>Control Positivo</b> DO450nm > CN/10	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo) 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes

BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES  
DIRECTOR TECNICO

721



**P. RESULTADOS.**

Los resultados se calculan por medio de un valor de corte (cut-off) hallado con la siguiente fórmula

$$\text{Valor de corte} = (\text{CN} + \text{CP}) / 5$$

**Nota Importante:** Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

**Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**

La interpretación de los resultados se realiza mediante la razón entre las DO a 450nm de las muestras y el Valor de corte Co/M. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

Co/M	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HDV. Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre colectada 1 ó 2 semanas después de la inicial. Un resultado positivo es indicativo de infección por HDV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente.

**Notas Importantes:**

- La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
- Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
- El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Control Negativo 2.100 - 2.200 - 2.000 DO450nm  
 Valor medio: 2.100 DO450nm  
 Mayor de 1.000 - Válido

Control Positivo: 0.100 DO450nm  
 Menor de CN/10 - Válido

Valor de corte = (2.100 + 0.100) / 5 = 0.440

Calibrador 0.300-0.260 DO450nm  
 Valor medio: 0.280 DO450nm  
 Dentro del rango CN/10 < DO450nm < CN/5 - Válido

Muestra 1. 0.020 DO450nm  
 Muestra 2: 1.900 DO450nm  
 Muestra 1 Co/M > 1.1 positiva  
 Muestra 2 Co/M < 0.9 negativa

**R. FUNCIONAMIENTO.**

La evaluación del funcionamiento ha sido realizada según lo reportado en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (art. 5, Capítulo 3 de las Directivas IVD 98/79/EC).

**1. LIMITE DE DETECCIÓN**

En ausencia de un estándar internacional, la sensibilidad del ensayo ha sido calculada por medio de un producto denominado Accurun n° 127 suministrado por Boston Biomedical Inc., Estados Unidos. La siguiente tabla muestra los valores de DO450nm para esta preparación, diluido en suero bovino fetal (SFB), para construir la curva de dilución límite en tres lotes diferentes:

Accurun # 127	Valores Co/M					
	DAB.CE	Lote # 1102	DAB.CE	Lote # 0103	DAB.CE	Lote # 0403
1x	0.171	3.0	0.163	2.9	0.158	2.8
2x	0.187	2.7	0.176	2.6	0.179	2.5
4x	0.230	2.2	0.220	2.1	0.207	2.2
8x	0.298	1.7	0.285	1.6	0.271	1.6
16x	0.417	1.2	0.405	1.1	0.402	1.1
32x	0.514	1.0	0.490	0.9	0.487	0.9
64x	0.717	0.7	0.700	0.7	0.705	0.6
128x	1.063	0.5	1.005	0.5	1.015	0.4
CTRL (-)	2.484	1.0000	2.261	1.0000	2.114	1.0000

**2. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA.**

La evaluación del procedimiento diagnóstica se realizó mediante un ensayo con más de 400 muestras frente a un equipo de referencia. Este ensayo clínico fue conducido por el Prof. M. Rizzetto, Departamento de Gastro-Hepatología del hospital S. Giovanni Battista de Turin, Italia. Se examinaron muestras negativas, positivas y otras que pudieran provocar interferencia. Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humano. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras. A continuación se muestran brevemente los resultados obtenidos:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

**3. PRECISIÓN.**

Se realizó un estudio con 3 lotes y dos muestras de diferente reactividad anti-HDV, examinados en 16 replicas, en tres tandas separadas. Los valores medios obtenidos se reportan a continuación:

DAB.CE: lote #1102

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	2.342	2.428	2.433	2.401
Desviación estándar	0.113	0.106	0.122	0.114
CV %	4.8	4.4	5.0	4.7

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	0.298	0.289	0.286	0.291
Desviación estándar	0.023	0.027	0.026	0.025
CV %	7.7	9.3	9.1	8.7
Co/M	1.6	1.7	1.7	1.7

DAB.CE: lote #0103

*Claudia Etcheves*

BIOARS S.A.  
 BIOC. CLAUDIA ETCHEVES  
 DIRECTOR TECNICO

*[Handwritten marks]*



Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	2.208	2.237	2.246	2.230
Desviación estándar	0.105	0.108	0.108	0.107
CV %	4.7	4.8	4.8	4.8

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	0.269	0.277	0.266	0.271
Desviación estándar	0.026	0.024	0.025	0.025
CV %	9.8	8.5	9.5	9.3
Co/M	1.7	1.7	1.7	1.7

DAB.CE: lote # 0403

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	2.246	2.221	2.182	2.216
Desviación estándar	0.097	0.103	0.118	0.106
CV %	4.3	4.6	5.4	4.8

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	0.286	0.273	0.280	0.280
Desviación estándar	0.027	0.023	0.026	0.025
CV %	9.3	8.5	9.1	9.0
Co/M	1.6	1.7	1.6	1.6

La variabilidad mostrada en las tablas no dió como resultado una clasificación errónea de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA.

- Engvall E. and Perlmann P., J.Immunochemistry 8: 874, 1971
- Engvall E. and Perlmann P., J.Immunol., 109: 129-135, 1971
- Chaggar K. Et al., Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991
- Lazinski D.W. et al., Journal of Virol., 67: 2672-2680, 1993
- Govindarajan S. et al., Microbiol. And Immunol., 95: 140-141, 1990
- Shattock A.G. et al., J.Clin.Microbiol., 29: 1873-1876, 1991
- Forbes B.A. et al., Clin.Microbiol.News., 13: 52-54, 1991
- Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989
- Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986
- Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988
- Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983
- Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128, 1980
- Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988
- Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Producido por  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes s.r.l.  
Via G. Carducci n°27 - Sesto San Giovanni (Mi) - Italia

S. LIMITACIONES.

La contaminación bacteriana de las muestras o la inactivación por calor pueden modificar los valores de absorbancia con la consiguiente alteración de los niveles del analito. Este ensayo es adecuado solo para el análisis de muestras individuales y no para mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que es necesario tomar en consideración la historia clínica y la sintomatología del paciente así como otros datos diagnósticos.



INDICACION AL CONSUMIDOR

Por cualquier información puede consultar al siguiente teléfono (011) 47713783 en el horario de 9,00 a 18,00 de Lunes a Viernes Personal de BIOARS S.A. estará a Vuestra disposición. La mercadería viaja por cuenta y riesgo del destinatario. Todo reclamo será atendido según lo prevee el "Manual de procedimiento para reclamos técnicos y devolución de mercadería" que BIOARS S.A. pone a disposición del Cliente.

Establecimiento Elaborador: Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l. Via G Carducci, n° 27, 20099, Sesto San Giovanni, Milán, Italia.  
Establecimiento Importador: BIOARS S.A. - Santo Domingo 2578/80 Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028  
Autorizado Ministerio de Salud N°

*Claudia Etchevés*

BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVÉS  
DIRECTOR TECNICO

Handwritten marks at the bottom left of the page.



# HDV Ag

**Ensayo inmunoenzimático para la  
determinación del Virus de la Hepatitis  
Delta en plasma y suero humanos**

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"

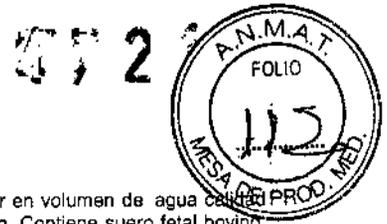


**DIA.PRO**  
Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milán) - Italia  
Teléfono +39 02 27007161  
Fax +39 02 26007726  
e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF DAG.CE  
96 pruebas

*Claudia Fatchev*  
BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA FATCHEV  
DIRECTOR TECNICO

f



# HDV Ag

## A. FINALIDAD PREVISTA.

Ensayo inmunoenzimático de tercera generación (ELISA) para la determinación del Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos.

El kit ha sido desarrollado para el seguimiento de pacientes infectados con HDV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

## B. INTRODUCCIÓN.

El Virus de la Hepatitis Delta es un virus ARN defectivo. Se compone de un núcleo con los antígenos delta específicos, y está encapsulado por el HBsAg. Para su replicación necesita ayuda funcional de HBV.

La infección por HDV ocurre en presencia de una infección aguda o crónica por HBV. Cuando se presenta simultáneamente la infección aguda por los dos virus, la enfermedad es grave y el cuadro clínico, así como las características bioquímicas son prácticamente indistinguibles de una infección por HBV. Sin embargo, una persona infectada por HBV de forma crónica puede soportar indefinidamente la replicación por HDV, normalmente la enfermedad es menos severa y aparece como exacerbación clínica.

La determinación de los marcadores serológicos específicos de HDV (HDV Ag, HDV Ab, HDV IgM y HDV IgG) representa una herramienta importante para los clínicos en la clasificación del agente etiológico, en el seguimiento de los pacientes así como en el tratamiento.

La detección de anticuerpos totales permite la clasificación de la enfermedad y el seguimiento de la seroconversión.

## C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El antígeno de HDV presente en la muestra es capturado, en la primera incubación, por un anticuerpo monoclonal específico. Se adiciona un detergente a la muestra para disolver el antígeno específico de la partícula viral.

En la segunda incubación, después del lavado, se adiciona otro anticuerpo anti-HDVAg conjugado con peroxidasa (HRP) que se une al antígeno capturado.

La concentración de la enzima conjugada, unida a la fase sólida es proporcional a la cantidad de HDVAg presentes en la muestra y su actividad se detecta por la adición del sustrato cromogénico en la tercera incubación.

La detección de HDVAg en la muestra se determina de manera semicuantitativa a través del cálculo de un valor de corte.

## D. COMPONENTES.

Cada kit contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

### 1. Microplaca: MICROPLATE

n°1 microplaca

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HDVAg en bolsas selladas con desecante.

### 2. Control Negativo: CONTROL

1x2.0ml/vial. Listo para el uso. Contiene albúmina del suero de cabra, tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4 +/-0.1, además de azida sódica 0.09% y Kathon GC 0.1% como conservantes. El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

### 3. Control Positivo: CONTROL+

1x2.0ml/vial. Control liofilizado para disolver en 2 ml de agua bidestilada. Contiene 5% albúmina del suero de cabra, alto título de antígeno recombinante HDV no infeccioso, tampón Tris-HCl 25 mM pH 7.4 +/-0.1, además de sulfato de gentamicina 0.02 mg/ml y Kathon GC 0.1% como conservantes.

### 4. Callbrador: CAL ...

n°1 vial. Liofilizado. Para disolver en volumen de agua calada EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero fetal bovino, bajo título de antígeno recombinante HDV no infeccioso, sulfato de gentamicina 0.02 mg/ml y Kathon GC 0.1% como conservantes.

*Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco, varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.*

### 5. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y Kathon GC al 0.1%.

### 6. Conjugado: CONJ

1x16ml/vial. Solución lista para el uso. Contiene 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, anticuerpo policlonal anti-HDV conjugado con peroxidasa (HRP), suero normal de ratón 1%, además de 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y Kathon GC 0.1% como conservantes. El conjugado está codificado con el color rojo.

### 7. Cromógeno/Sustrato SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

*Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.*

### 8. Diluyente de muestras: DILSPE

1x16ml. Contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.4 +/- 0.1, NP40 6%, además de azida sódica 0.09% y Kathon GC 0.1% como conservantes.

### 9. Ácido Sulfúrico: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M

Atención: Irritante (Xi R36/38; S2/26/30).

### 10. Sellante adhesivo, n°2

### 11. Manual de instrucciones, n°1

## E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (150µl, 100µl y 50µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (Bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C, con agitación a 1300 rpm +/-150.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y posibilidad de 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

## F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El kit debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes libres de talco y gafas. Evitar el uso de

Handwritten signature and initials.

Handwritten signature and stamp: DIRECTOR TÉCNICO

4721



- objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
  4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los kits, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/ substrato (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
  5. Conservar el kit a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
  6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes kits.
  7. Comprobar que los reactivos son claros y no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al supervisor para realizar el procedimiento pertinente.
  8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/ plasma usando puntas desechables, cambiándolas después de su uso.
  9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del kit usando puntas desechables, cambiándolas después de su uso.
  10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase externo y en las etiquetas internas (viales) de los reactivos. En un estudio realizado con un kit abierto no se ha detectado la pérdida de actividad relevante utilizándolo hasta 6 veces y durante un período de hasta 3 meses.
  11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
  12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
  13. Los desechos producidos durante el uso del kit deben de ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado, así como de controles y muestras deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C durante 20 minutos.
  14. En caso de derrame accidental de las muestras o algún reactivo, se debe utilizar papel absorbente humedecido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
  15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
  16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del kit (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

**G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES:**

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa, preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica, ya que pudiera afectar la actividad enzimática del conjugado, provocando resultados falsos negativos.
3. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o cuerpos y filamentos microbianos.
5. Suero y plasma pueden conservarse hasta 5 días, a partir del momento de la extracción, a una temperatura entre 2 y 8°C. Para periodos de conservación más largos, las muestras deben almacenarse a -20°C, evitando congelar/descongelar cada muestra más de una vez porque pueden generarse partículas que podrían afectar al desarrollo de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

**H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.**

En un estudio realizado con un kit abierto no se ha detectado la pérdida relevante de actividad relevante utilizándolo hasta 6 veces y durante un período de hasta 3 meses.

**Microplacas:**

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

**Control Negativo:**

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar.

**Control Positivo:**

Disolver en 2 mL agua de calidad ELISA y mezclar bien en el vórtex antes de usar.

El control positivo no contiene partículas infectivas ya que contiene antígenos recombinantes sintéticos.

*Nota: Una vez reconstituido, el control no es estable. Se recomienda mantenerlo congelada en alícuotas a -20°C.*

**Calibrador:**

Añadir al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver totalmente y mezclar suavemente en el vórtex.

*Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.*

**Solución de Lavado Concentrada:**

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse en agua bidestilada y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y

Handwritten signature or initials in the bottom left corner.

Handwritten signature and stamp: **BIOANIS S.A. BIOQ. CLAUDIA FICHEVES DIRECTORA TÉCNICA**



burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

**Nota:** Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

**Conjugado:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

**Cromógeno/ Substrato:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

**Diluyente de Muestras**

Listo para el uso. Mezclar con vórtex suavemente, evitando la formación de espuma, antes de usar.

**Ácido Sulfúrico:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Atención: Irritante (Xi R36/38; S2/26/30)

Leyenda:

R 36/38 = Irritante a los ojos y la piel.

S2/26/30 = En caso de contacto con los ojos, lavarse inmediata y abundantemente con agua y acudir a un médico.

**I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL KIT.**

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol, lejía 10%, desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas.
2. La estufa de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El lavador de ELISA es extremadamente importante para la realización del ensayo. Antes de emplearse en los ensayos de rutina del laboratorio, debe ser cuidadosamente optimizado y validado usando los controles/calibrador y paneles de referencia pertinentes. Para asegurar que el ensayo se realiza conforme lo esperado, normalmente basta con 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350µl/pocillo de solución de lavado = 1 ciclo). Se recomienda un tiempo entre ciclos de 20-30 segundos. Para establecer correctamente el número de lavados se recomienda efectuar el ensayo con los controles/calibrador del kit, así como sueros positivos y negativos de referencia tratando de ajustarlos a los valores indicados en la sección "Control de calidad interno" y "Procedimiento del ensayo". La calibración periódica del volumen a dispensar y el mantenimiento (descontaminación y lavado de las agujas) debe hacerse según las instrucciones del fabricante.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y, si es posible, de un segundo filtro (620-630nm) para reducir interferencias en la lectura. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica y mantenido según las normas del fabricante.

6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control de calidad interno" y "Procedimiento del ensayo". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y las de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de resultados falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el cribado en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el kit, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

**L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.**

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del kit (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de éste con una pipeta estéril de plástico. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
3. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
4. Disolver el Calibrador y el Control Positivo como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
5. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
6. Ajustar la estufa de ELISA a 37°C y cargar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado de acuerdo a los parámetros de validación del instrumento para usar con el kit.
7. Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
8. En caso de trabajar automáticamente, conectar el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
9. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
10. Asegurarse de que el resto del equipo a utilizar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
11. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

**M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.**

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

1. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Identificar cuidadosamente los pocillos de controles, calibradores y muestras.
2. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.

*Signature*  
BIO...  
BIOQ. CLAUDIA TICHEV.  
DIRECCION TECNICO

*Handwritten marks*



3. Dispensar 100µl del Control Negativo, por triplicado, 100µl de Calibrador, por duplicado, y 100µl del Control Positivo. Posteriormente, añadir 100µl de cada muestra.
4. Comprobar la presencia de las muestras en los pocillos a simple vista (existe una marcada diferencia de color entre los llenos y los vacíos) o por lectura a 450/620nm (la densidad óptica de las muestras es superior a 0.100).
5. Dispensar 100µl del Diluyente de muestras en todos los pocillos, excepto en el A1.
6. Incubar la microplaca 120 min a +37°C.

**Nota importante:** Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace la prueba manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

7. Tras la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
8. Dispensar 100µl del Conjugado en todos los pocillos, excepto el A1, usado para el blanco.

**Nota importante:** Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.

9. Tras la adición del Conjugado comprueba que el color en los pocillos ha cambiado a rojo, después incuba la microplaca 60 min a +37°C.
10. Tras la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
11. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1.

**Nota importante:** No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

12. Incubar la microplaca protegida de la luz a temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos. Los pocillos con Control Positivo y muestras positivas deben pasar de un tono claro a azul.
13. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática usando la misma secuencia que en el paso 11. La adición de la solución de parada cambia el color del Control Positivo y de las muestras positivas de azul a amarillo.
14. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y, si es posible, otro de 620-630 nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

**Notas importantes:**

1. Si no se puede utilizar el segundo filtro, asegurarse de que no hay impresiones digitales en el polvo en el fondo de los pocillos antes de leer a 450nm. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir autooxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

**N. ESQUEMA DEL ENSAYO.**

Controles & Calibrador	100µl
Muestras	100µl
Diluyente de muestras	100µl
<b>1ª incubación</b>	<b>120 min</b>
Temperatura	+37°C
Lavado	nº 4-5
Conjugado	100µl
<b>2ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Lavado	nº 4-5
Cromógeno/Substrato	100µl
<b>3ª incubación</b>	<b>20 min</b>
Temperatura	t.a.*
Acido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm

t.a.\*temperatura ambiente

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

**Microplaca**

		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M2										
B	CN	M3										
C	CN	M4										
D	CN	M5										
E	CAL	M6										
F	CAL	M7										
G	CP	M8										
H	M1	M9										

Legenda: BL = Blanco CN = Control Negativo  
CAL = Calibrador CP = Control Positivo M = Muestra

**O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.**

Se realiza un grupo de pruebas con los controles/calibrador cada vez que se usa el kit para verificar si los valores DO450nm o M/Co son los esperados.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Requerimientos
Pocillo Blanco	Valor < 0.100 DO a 450nm
Control Negativo (CN)	Valor < 0.100 DO a 450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Calibrador	M/Co > 1
Control Positivo (CP)	Valor > 1.000 DO a 450nm

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.

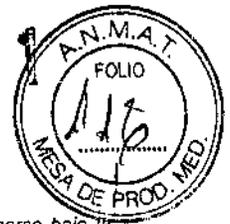
En caso contrario, no siga adelante y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100DO450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control Negativo (CN) > 0.100 DO450nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cargado con la misma antes del uso.

*[Handwritten signature]*

310  
BIOQ CLAS  
DIRECT

7721



Coefficiente de variación > 30%	3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas, a salpicaduras o al conjugado 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co < 1	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Control Positivo < 1.000 DO a 450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, informe al supervisor para tomar las medidas pertinentes.

**P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE.**

Los resultados se calculan por medio de un valor de corte (cut-off) hallado con la siguiente fórmula:

**Valor de corte = CN medio DO450nm + 0.100**

El valor encontrado para el ensayo se usa para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación:

*Nota Importante:* Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

**Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**

La interpretación de los resultados se realiza mediante la razón entre las DO a 450nm de las muestras y el Valor de corte M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equivoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HDV (fase aguda).

Cualquier paciente, cuya muestra resulte equivoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre extraída 1 ó 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de infección por HDV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente.

**Notas Importantes:**

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Los resultados positivos deben ser confirmados realizando las pruebas para detectar los otros marcadores de HDV, antes de emitir cualquier diagnóstico de hepatitis viral.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar:

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio:

Control Negativo: 0.020 - 0.030 - 0.025 DO450nm  
 Valor medio: 0.025 DO450nm  
 Menor de: 0.100 - Válido

Control Positivo: 2.489 DO450nm  
 Mayor de 1.000 - Válido

Valor de corte = 0.025 + 0.100 = 0.125

Calibrador: 0.280 - 0.290 DO450nm  
 Valor medio: 0.285 DO450nm M/Co = 2.3  
 M/Co Mayor de 1 - Válido

Muestra 1: 0.030 DO450nm  
 Muestra 2: 1.800 DO450nm  
 Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa  
 Muestra 2 M/Co > 1.1 = positiva

**R. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO.**

La evaluación del funcionamiento ha sido realizada según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (art. 5, Capítulo 3 de la Directiva IVD 98/79/EC).

**1. LÍMITE DE DETECCIÓN.**

No se dispone de un estándar Internacional para la detección de HDVAg hasta el momento. Con el objetivo de garantizar una sensibilidad constante y óptima fue definido un Gold Standard Interno (IGS), a partir de un paciente en fase aguda de la infección.

El límite de detección del ensayo ha sido calculado usando un kit comercial europeo como referencia.

Se construyó una curva de dilución límite a partir de plasma negativo.

Los resultados del Control de Calidad se muestran en la siguiente tabla:

Gold Standard Interno (IGS)

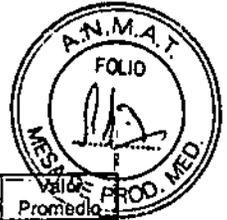
IGS dilución	Lote # 1102		Lote # 0103		Lote # 0403		DiaSorin
	DO 450nm	M/Co	DO 450nm	M/Co	DO 450nm	M/Co	
2 K	0.486	4.4	0.539	4.7	0.504	4.7	4.5
4 K	0.266	2.4	0.289	2.5	0.304	2.9	2.5
8 K	0.151	1.4	0.144	1.3	0.163	1.5	1.3
16 K	0.071	0.6	0.078	0.7	0.081	0.8	0.7
Control Negativo	0.011	###	0.015	###	0.008	###	###

**2. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA.**

La sensibilidad diagnóstica ha sido probada utilizando paneles de muestras clasificadas como positivas por un kit de referencia europeo.

*[Handwritten Signature]*  
 BIOQ CLAUDIA TICHEVES  
 DIRECCIÓN TÉCNICO

4721



Se recogieron muestras positivas de pacientes en etapa aguda de la infección por HDV.

La especificidad diagnóstica ha sido determinada utilizando paneles de más de 250 muestras, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante un kit de referencia.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humano para determinar la especificidad. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Las muestras congeladas han sido probadas para comprobar si la congelación interfiere con el funcionamiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

Se examinaron muestras procedentes de pacientes afectados por hepatitis virales (HCV, HAV) y no virales, que pudieran provocar interferencia en el ensayo, sin embargo no se observó reacción cruzada.

La evaluación del funcionamiento se realizó mediante un ensayo con más de 300 muestras, en un centro de referencia externo calificado. Se obtuvieron los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

**3. PRECISIÓN.**

La precisión ha sido calculada con 3 muestras, examinadas en réplicas en series diferentes.

Se realizó un estudio con 3 muestras de diferente reactividad antigénica, examinadas en 16 réplicas, en tres series separadas.

Los valores medios obtenidos se informan a continuación:

DAG.CE: lote # 1102

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	0.021	0.020	0.019	0.020
Desviación estándar	0.004	0.005	0.004	0.004
CV %	17.7	22.7	19.3	19.9

IGS a 8 K (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	0.167	0.166	0.169	0.167
Desviación estándar	0.006	0.008	0.005	0.006
CV %	3.9	4.6	3.1	3.9
M/Co	1.3	1.4	1.4	1.4

IGS a 0.5 K (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	2.416	2.404	2.372	2.397
Desviación estándar	0.150	0.143	0.130	0.141
CV %	6.2	5.9	5.5	5.9
M/Co	19.9	20.0	19.9	19.9

DAG.CE: lote # 0103

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	0.019	0.020	0.018	0.019
Desviación estándar	0.003	0.004	0.003	0.003
CV %	17.6	19.4	17.7	18.2

IGS a 8 K (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	0.180	0.180	0.181	0.180
Desviación estándar	0.007	0.008	0.008	0.008
CV %	3.8	4.5	4.4	4.3
M/Co	1.5	1.5	1.5	1.5

IGS a 0.5 K (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	2.415	2.453	2.437	2.435
Desviación estándar	0.135	0.131	0.153	0.140
CV %	5.6	5.3	6.3	5.7
M/Co	20.3	20.4	20.7	20.5

DAG.CE: lote #0403

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	0.015	0.016	0.015	0.015
Desviación estándar	0.003	0.003	0.003	0.003
CV %	17.7	18.8	19.3	18.6

IGS a 8 K (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	0.170	0.169	0.172	0.170
Desviación estándar	0.008	0.008	0.008	0.008
CV %	4.8	4.7	4.5	4.7
M/Co	1.5	1.5	1.5	1.5

IGS a 0.5 K (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor Promedio
DO 450nm	2.378	2.370	2.393	2.380
Desviación estándar	0.103	0.094	0.099	0.099
CV %	4.4	4.0	4.1	4.2
M/Co	20.9	20.6	21.0	20.8

La variabilidad mostrada en las tablas no dió como resultado una clasificación errónea de las muestras.

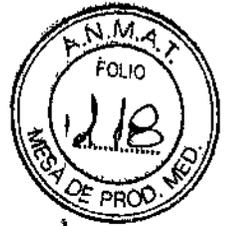
**S. LIMITACIONES.**

Los falsos positivos fueron estimados como menos del 2% de la población normal, debido mayormente a altos títulos de Anticuerpos Heterofílicos anti-ratón (HAMA).

Las muestras que tras ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

*Yacine...*

BIOANALISA  
BIOO. CLAUDETTA CHEVE  
DIRECCION TECNICO



4721

**BIBLIOGRAFÍA.**

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
3. Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991
4. Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993
5. Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140-141, 1990
6. Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991
7. Forbes B A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991
8. Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989
9. Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986
10. Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988
11. Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983
12. Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128, 1980
13. Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988
14. Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986
15. Grebenchtchikov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2):219-231, 2002
16. Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550-561, 1998

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Producido por  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes s.r.l.  
Via G. Carducci n°27 - Sesto San Giovanni (Mi) - Italia

CE  
0318

**INDICACION AL CONSUMIDOR**

Por cualquier información puede consultar al siguiente telefono: (011) 47713783 en el horario de 9,00 a 18,00 de Lunes a Viernes Personal de BIOARS S.A. estará a Vuestra disposición.  
La mercadería viaja por cuenta y riesgo del destinatario. Todo reclamo será atendido según lo prevé el "Manual de procedimiento para reclamos técnicos y devolución de mercadería" que BIOARS S.A. pone a disposición del Cliente

Establecimiento Elaborador: Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l. Via G Carducci, n° 27, 20099, Sesto San Giovanni, Milán, Italia.  
Establecimiento Importador BIOARS S.A - Santo Domingo 2578/80  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés -  
Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028  
Autorizado Ministerio de Salud N°

*Claudia Etchevés*  
BIOARS S.A.  
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES  
DIRECTORA TÉCNICA

**ORIGINAL**



# HDV IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA)  
de "captura" para la determinación  
de anticuerpos IgM frente al  
virus de la hepatitis Delta  
en plasma y suero humanos**

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"



**DIA.PRO**  
Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milán) - Italia  
Teléfono +39 02 27007161  
Fax +39 02 26007726  
e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF DIM.CE  
96 pruebas

*Claudia Etcheverri*  
BIOARS S.A.  
BIOO. CLAUDIA ETCHEVERRI  
DIRECTOR TÉCNICO

*[Handwritten marks]*



# IgM HDV

## A. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de la clase IgM frente al Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos, mediante un sistema de captura. El equipo ha sido desarrollado para la clasificación del agente vírico infeccioso y para el seguimiento de pacientes infectados con HDV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

## B. INTRODUCCIÓN.

El Virus de la Hepatitis Delta es un virus ARN defectivo. Se compone de un núcleo con los antígenos delta específicos, y está encapsulado por el HBsAg. Para su replicación necesita ayuda funcional de VHB.

La infección por HDV ocurre en presencia de una infección aguda o crónica por VHB. Cuando se presenta simultáneamente la infección aguda por los dos virus, la enfermedad es grave y el cuadro clínico, así como las características bioquímicas, son prácticamente indistinguibles de una infección por VHB sólo. Sin embargo, una persona infectada por VHB de forma crónica puede soportar indefinidamente la replicación del HDV, normalmente la enfermedad es menos grave y aparece como exacerbación clínica.

La determinación de los marcadores serológicos específicos de HDV (Ac HDV, IgM HDV e IgG HDV) representa una herramienta importante para los clínicos en la clasificación del agente etiológico, en el seguimiento de los pacientes y en el tratamiento.

La detección de anticuerpos IgM e IgG frente al HDV permite la clasificación de la enfermedad y la monitorización de la seroconversión.

## C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-IgM que, durante la primera incubación, captura específicamente esta clase de anticuerpos.

En la segunda incubación, después del lavado, se añade un inmunocomplejo (un antígeno recombinante del HDV y un anticuerpo específico) marcado con peroxidasa (HRP), a fin de detectar los anticuerpos anti-HDV clase IgM unidos a la fase sólida.

Después del lavado, la enzima capturada en la fase sólida se combina con la mezcla cromógeno/substrato, generando una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM presentes en la muestra.

## D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

### 1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras intercambiables de 8 pocillos, recubiertos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgM humano purificado, en bolsas selladas con desecante. Se deben poner las placas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

### 2. Control negativo: CONTROL -

1x2.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene anticuerpos humanos negativos al HDV, 3% de leche descremada, tampón Tris-0.2M a pH 6.0 +/-0.1, 0.2% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y Kathon GC 0.1% como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

### 3. Control positivo: CONTROL +

1x2.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene anticuerpos IgM humanos positivos al HDV, 3% de leche descremada, tampón Tris 0.2M a pH 6.0 +/-0.1, 0.2% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y Kathon GC 0.1% como conservantes.

El control positivo está codificado con el color verde-amarillo.

**Nota importante: Aun cuando los anticuerpos han sido inactivados químicamente, manipule el material como potencialmente infeccioso.**

### 4. Calibrador: CAL ...

n° 1 vial. Reactivo liofilizado para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero fetal bovino, anticuerpos humanos clase IgM frente a HDV, además de sulfato de gentamicina 0.2 mg/ml y Kathon GC 0.1% como conservantes.

### Notas importantes:

1. El volumen necesario para disolver el contenido del vial, varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

2. Aun cuando los anticuerpos han sido inactivados químicamente, manipule el material como potencialmente infeccioso.

### 5. Solución de lavado concentrada: WASHBUF 20X

1x60ml/frasco. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% de Tween 20 y Kathon GC 0,1%.

### 6. Conjugado 20X: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. Solución concentrada 20X. Contiene anticuerpo policlonal anti-HDV conjugado con peroxidasa (HRP). El reactivo se disuelve en una solución tampón: tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 5% de albúmina de suero bovino, Kathon GC 0.1% y 0.02% de sulfato de gentamicina como conservantes..

### 7. Antígeno HDV: Ag HDV

1x6 viales. Reactivo liofilizado para disolver en 1.9 ml del diluyente adecuado. Contiene antígeno recombinante HDV, no infeccioso, tampón Tris 25 mM a pH 7.8 +/-0.1 y 5% de proteínas del suero humano.

### 8. Diluyente de antígeno HDV: Ag DIL

1x16 ml/vial. Solución tamponada para la disolución del antígeno HDV liofilizado. Contiene tampón Tris 0.2M a pH 6.0 +/- 0.1, Kathon GC 0.1% y 0.2% de Tritón 100X. El componente está codificado con el color rojo.

### 9. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60.0 ml/vial. Solución tamponada para la disolución de las muestras. Contiene tampón Tris 0.2M a pH 6.0 +/- 0.1, 3% de leche descremada, 0.2% de Tween 20, azida sódica 0.09% y Kathon GC 0.1% como conservantes. El reactivo está codificado con el color azul.

### 10. Cromógeno/substrato SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

**Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.**

### 11. Ácido sulfúrico: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M  
Atención: irritante (Xi R36/38; S2/26/30).

### 12. Sellador adhesivo n°2

### 13. Manual de instrucciones n°1



**E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS**

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) ajustado a +37°C.
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

**F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar los indumentarios protectores adecuados de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/substrato (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa (envase primario) y en las etiquetas internas (viales).
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del procedimiento de lavado, de restos de controles y muestras deben ser tratados como material

- potencialmente infeccioso y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con una concentración final de lejía al 10% durante 16 a 18 horas o la inactivación con calor mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
  15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
  16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

**G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES**

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica, ya que puede afectar la actividad enzimática del conjugado.
3. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado de unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras y la lectura electrónica.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. Suero y plasma pueden conservarse hasta 5 días, a partir del momento de la extracción, a una temperatura entre 2 y 8°C. Para períodos de conservación más largos, las muestras pueden almacenarse a -20°C durante varios meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez porque se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0.2-0.8 micras.

**H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES**

En un estudio realizado con un equipo abierto no se ha detectado pérdida de actividad relevante utilizándolo hasta 6 veces y durante un período de hasta 3 meses.

**Microplacas:**

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, llame al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

**Controles negativo y positivo:**

Lista para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

**Calibrador:**

Reactivo liofilizado para disolver con agua de calidad EIA, según lo indicado en la etiqueta.

LABORATORIO DE PROD. MED.  
FOLIO 137



**Nota:** El calibrador disuelto no es estable. Se recomienda almacenar congelado en alícuotas a -20°C.

**Solución de lavado concentrada:**

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada hasta 1200 ml y mezclarse suavemente antes de usarse.

Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de lavado.

**Nota:** Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

**Inmunocomplejo:**

Disolver el antígeno HDV liofilizado en 1.9 ml de diluyente de antígeno HDV y mezclar suavemente hasta disolver completamente el contenido del vial.

Cuando el polvo se haya disuelto completamente, añadir 100 µl del Conjugado concentrado 20X y mezclar suavemente en un vórtex.

**Notas importantes:**

1. La preparación de inmunocomplejo debe efectuarse justo después de dispensar en la placa los controles, el calibrador y las muestras.
2. El inmunocomplejo preparado así no es estable en estado líquido. Separar en alícuotas y congelar a -20°C el inmunocomplejo no utilizado. Descongelar una sola vez y no usar este material congelado después de la fecha de caducidad del equipo.

**Diluyente de muestras:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

**Cromógeno/substrato:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

**Ácido sulfúrico:**

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Atención: Irritante (Xi R36/38; S2/26/30)

Leyenda: R 36/38 = Irritante para ojos y piel.

S2/26/30 = En caso de contacto con los ojos, enjuagar de inmediato con agua abundante y consultar a un médico.

**I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO**

1. Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (etanol 70%, lejía 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.
2. La incubadora ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.

3. El lavador ELISA es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. Antes de emplearlo en los ensayos de rutina del laboratorio, debe ser cuidadosamente optimizado y validado usando los controles/calibrador y paneles de referencia pertinentes. Para asegurar que el ensayo se realiza conforme lo esperado, normalmente basta con 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350µl/pocillo de solución de lavado = 1 ciclo). Se recomienda un tiempo de remojo entre ciclos de 20-30 segundos. Para establecer correctamente el número, se recomienda efectuar el ensayo con los controles/calibrador del equipo y muestras positivas y negativas de referencia bien caracterizadas, tratando de ajustarlos a los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". La calibración periódica del volumen a dispensar (descontaminación y lavado de las agujas) debe hacerse según las instrucciones del fabricante.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de +/-5%.
5. El lector de microplaca ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630 nm, recomendado) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda <=10nm b) Rango de absorbancia de 0 a >=2.0, c) Linealidad >=2.0, reproducibilidad >=1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa para el cribado en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por serie.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar con el equipo.

**L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO**

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no están contaminados con partículas ni agregados visibles. Comprobar que el cromógeno/substrato es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico. Comprobar que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no está perforada ni dañada.
3. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
4. Disolver el calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
5. Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.

*Guadalupe*

*[Handwritten marks]*



6. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado de acuerdo a los parámetros de validación del instrumento para usar con el equipo.
7. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
8. Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
9. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
10. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
11. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

(lectura) y otro de 620-630nm (substracción del fondo recomendado), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

**Notas importantes:**

1. Si no se puede utilizar el segundo filtro, asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer a 450nm. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debería hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos más de 20 minutos de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

**M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación; es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

1. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico e identificar cuidadosamente los pocillos para estándares y muestras.
2. Diluir las muestras 1:200 dispensando en un tubo desechable 1 ml de diluyente de muestras y 5 µl de muestra, mezclar con vórtex antes de usar. No es necesario diluir los controles ni el calibrador, ya que están listos para el uso.
3. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
4. Dispensar 100 µl del control negativo, por triplicado, 100µl de calibrador, por duplicado, y 100 µl del control positivo.
5. Posteriormente, añadir 100µl de muestras diluidas en sus respectivos pocillos.
6. Incubar la microplaca 60 min a +37°C.

**N. ESQUEMA DEL ENSAYO**

Controles y calibrador	100 µl
Muestras diluidas (1:200)	100 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Pasos de lavado	nº 4-5
Inmunocomplejo	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37°C
Pasos de lavado	nº 4-5
Cromógeno/substrato	100µl
<b>3ª incubación</b>	<b>20 min</b>
Temperatura	t.a.*
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450 nm

\*t.a.: temperatura ambiente

**Notas importantes:**

- a. Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.
- b. Preparar el inmunocomplejo según se ha descrito.
7. Tras la primera incubación, lavar los pocillos como se ha descrito previamente (sección I.3).
8. Dispensar 100 µl del inmunocomplejo en todos los pocillos, excepto el A1. Incubar la microplaca 60 min a +37°C.

En la tabla siguiente se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M2											
B	CN	M3											
C	CN	M4											
D	CN	M5											
E	CAL	M6											
F	CAL	M7											
G	CP	M8											
H	M1	M9											

Legenda: BL = Blanco    CN = Control Negativo  
CAL = Calibrador    CP = Control Positivo    M = Muestra

**Nota importante:** Hay que tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta. Podría producirse contaminación.

9. Tras la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
10. Dispensar 100 µl de cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el A1.

**Nota importante:** No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

11. Incubar la microplaca protegida de la luz a temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos. Los pocillos con muestras positivas, el control positivo y el calibrador pasarán de un tono claro a azul.
12. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática usando la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del control positivo, el calibrador y las muestras positivas de azul a amarillo.
13. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450nm

**O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO**

Se realiza una comprobación en los controles/calibrador cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores DO450nm o M/Co son los esperados en el análisis. Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Requerimientos
Pocillo blanco	Valor < 0.100 DO450nm
Control negativo (CN)	Valor < 0.200 DO450nm después de leer el blanco
Coefficiente de variación	< 30%
Calibrador	M/Co > 2.5
Control positivo (CP)	> 0.900 DO450nm

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección. En caso contrario, no siga adelante y compruebe:

*Handwritten signature*



Problema	Comprobar que
Pocillo blanco > 0.100 DO a 450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control negativo (CN) > 0.200 DO a 450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas, a derrames o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co < 2.5	1. el procedimiento ha sido ejecutado correctamente. 2. no se han cometido errores en su distribución. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del estándar.
Control positivo < 0.900 DO450nm	1. el procedimiento ha sido ejecutado correctamente 2. no se han cometido errores durante la distribución del control. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si se ha producido alguno de los problemas anteriores, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

**P. CÁLCULO DE DATOS**

Si la prueba resulta válida, los resultados se calculan a partir del valor medio de DO450nm del Control Negativo (CN) por medio de un Valor de Corte (Co) determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0.250$$

*Nota importante: Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un equipo automatizado de ELISA, es necesario asegurarse de que se utiliza la formulación adecuada para generar la correcta interpretación de los resultados.*

**Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

La interpretación de los resultados se realiza mediante la razón entre la DO a 450 nm de las muestras y el valor de corte (M/Co), según se aprecia en la tabla siguiente:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HDV (fase aguda).

Cualquier paciente cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre extraída 1 ó 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de infección en curso por HDV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente.

**Notas importantes:**

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Todas las muestras positivas deben someterse a la prueba de confirmación descrito en la sección T antes de emitir el resultado de positividad. Mediante la realización de dicha prueba pueden detectarse —y descartarse— reacciones falsas, causantes de interpretaciones erróneas del resultado analítico.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico cualificado.

A continuación se describe un ejemplo de los cálculos a realizar:

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos por el usuario:

Control negativo: 0.100 – 0.120 – 0.080 DO450nm  
 Valor medio: 0.100 DO450nm  
 Menor de: 0.200 – Válido

Control positivo: 2.000 DO450nm  
 Mayor de 0.900 – Válido

Valor de corte = 0.100+0.250 = 0.350

Calibrador: 1.000 – 1.100 DO450nm  
 Valor medio: 1.050 DO450nm    M/Co = 3.0  
 M/Co mayor de 2.5 – Válido

Muestra 1: 0.080 DO450nm  
 Muestra 2: 1.800 DO450nm  
 Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa  
 Muestra 2 M/Co > 1.1 = positiva

**R. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**

La evaluación del rendimiento ha sido realizada según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (Art. 5, Capítulo 3 de la Directiva IVD 98/79/CE).

**1. Límite de detección.**

Ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgM anti-HDV ha sido definido en las ETC.

Con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, fue definido un estándar de oro interno (IGS), a partir de un paciente en fase aguda de la infección.

El límite de detección del ensayo ha sido calculado en tres lotes, usando un equipo comercial europeo como referencia.

Se preparó una curva de dilución límite en plasma negativo. Los resultados del control de calidad se muestran en la siguiente tabla:

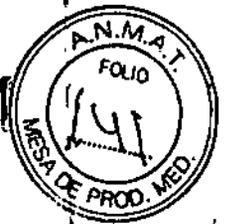
Estándar de oro Interno (IGS)

IGS	Lot n.º 1102	Lot n.º 0163	Lot n.º 0403	DieSorin			
dilución	DO450nm	M/Co	DO450nm	M/Co	DO450nm	M/Co	M/Co
1 X	0.728	2.5	0.783	2.6	0.837	2.7	2.8
2 X	0.443	1.5	0.461	1.5	0.471	1.5	1.4
4 X	0.286	1.0	0.291	0.9	0.305	1.0	1.0
8 X	0.154	0.5	0.160	0.5	0.165	0.6	0.5
Plasma -	0.039	0.1	0.054	0.2	0.065	0.2	0.2

*Handwritten signature*

*Handwritten marks*

472



**2. Especificidad y sensibilidad diagnóstica**

La evaluación del rendimiento diagnóstico se realizó mediante un ensayo con más de 400 muestras frente a un equipo de referencia europeo realizado por el Prof. M. Rizzetto, Departamento de Gastro-Hepatología del hospital S. Giovanni Battista de Turín, Italia.

Se recogieron muestras positivas de pacientes en etapa aguda de la infección por HDV.

La especificidad clínica ha sido determinada utilizando paneles de más de 250 muestras, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia.

Se emplearon, además, plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humano para determinar la especificidad. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de preparación de muestras.

Las muestras congeladas también se han probado para comprobar si la congelación interfiere con el rendimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de partículas.

Se examinaron muestras procedentes de pacientes afectados por hepatitis víricas (HCV, HVA) y patologías no víricas del hígado, que pudieran provocar interferencia en el ensayo, sin embargo no se observó reacción cruzada.

El estudio del rendimiento se realizó mediante un ensayo con más de 400 muestras, en un centro de referencia externo cualificado. Se obtuvieron los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

**3. Reproducibilidad.**

Ha sido calculada con tres muestras, examinadas en réplicas en series diferentes.

Se realizó un estudio con 3 muestras de diferente reactividad IgM HDV, examinadas en 18 réplicas, en tres series separadas. Los valores medios obtenidos se facilitan a continuación:

DIM.CE:lote n. ° 1102

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	0.061	0.056	0.056	0.058
Desviación estándar	0.008	0.007	0.007	0.008
CV %	13.9	13.0	12.9	13.3

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	0.798	0.810	0.802	0.803
Desviación estándar	0.044	0.041	0.046	0.044
CV %	5.5	5.1	5.7	5.4
M/Co	2.6	2.6	2.6	2.6

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	2.133	2.143	2.134	2.137
Desviación estándar	0.081	0.081	0.095	0.086
CV %	3.8	3.8	4.4	4.0
M/Co	6.9	7.0	7.0	7.0

DIM.CE:lote n. ° 0103

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	0.062	0.059	0.068	0.062
Desviación estándar	0.008	0.005	0.006	0.006
CV %	12.4	9.3	9.2	10.3

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	0.843	0.843	0.826	0.837
Desviación estándar	0.051	0.051	0.045	0.049
CV %	6.0	6.0	5.4	5.8
M/Co	2.7	2.7	2.7	2.7

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	2.299	2.278	2.227	2.268
Desviación estándar	0.115	0.102	0.112	0.110
CV %	5.0	4.5	5.0	4.8
M/Co	7.4	7.4	7.0	7.3

DIM.CE:lote n. ° 0403

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	0.066	0.070	0.067	0.068
Desviación estándar	0.006	0.008	0.008	0.007
CV %	9.8	10.7	11.3	10.6

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	0.800	0.813	0.815	0.809
Desviación estándar	0.044	0.046	0.049	0.046
CV %	5.5	5.7	6.0	5.7
M/Co	2.5	2.5	2.8	2.5

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1 <sup>a</sup> serie	2 <sup>a</sup> serie	3 <sup>a</sup> serie	Valor promedio
DO 450nm	2.352	2.328	2.339	2.340
Desviación estándar	0.093	0.098	0.105	0.099
CV %	3.9	4.2	4.5	4.2
M/Co	7.5	7.3	7.4	7.4

La variabilidad mostrada en las tablas no dio como resultado una clasificación errónea de las muestras.

**S. LIMITACIONES**

Los falsos positivos fueron estimados como menos del 2% de la población normal, debido principalmente a altos títulos de Factor Reumatoide.

Las muestras que tras ser descongeladas presentan partículas de fibrina o agregados pueden generar algunos resultados falsos positivos.

*[Handwritten signature]*

4721



**T. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN**

La prueba de confirmación debe realizarse en todas las muestras positivas antes de remitir el diagnóstico de infección primaria por HDV al médico.

Proceder del modo siguiente para la confirmación:

1. Preparar el complejo antígeno/conjugado tal como se describe en la sección correspondiente. Este reactivo se denomina Solución A.
2. A continuación, se diluyen 25 µl de conjugado enzimático concentrado en 500 µl de diluyente para antígeno y mezclar suavemente usando un vórtex. ¡No utilizar ningún vial de antígeno HDV liofilizado para este procedimiento! Esta solución se denomina Solución B.
3. Dejar el pocillo A1 de la tira vacío para el blanco.
4. El Control negativo se dispensa en las posiciones B1+C1 de la tira. Esto se utiliza para el cálculo de los valores de corte y M/Co.
5. La muestra positiva a confirmar se dispensa diluida al 1:201 en las posiciones D1+E1 de la tira.
6. La tira se incuba durante 60 minutos a +37°C.
7. Tras el lavado, el pocillo blanco A1 se deja vacío.
8. Se dispensan 100 µl de Solución A en los pocillos B1+C1+D1.
9. A continuación, se añaden 100 µl de Solución B al pocillo E1.
10. La tira se incuba durante 60 minutos a +37°C.
11. Tras el lavado, se añaden 100 µl de cromógeno/sustrato a todos los pocillos y la tira se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
12. Se añaden 100 µl de ácido sulfúrico a todos los pocillos y entonces se mide la intensidad del color de éstos a 450nm (filtro de lectura) y, si es posible, a 620-630nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

La interpretación de los resultados se realiza del modo siguiente:

1. Si la muestra del pocillo D1 presenta un valor de M/Co inferior a 0,9, es probable que haya ocurrido un problema de dispensación o de contaminación en la primera prueba. Debe repetirse el procedimiento de ensayo descrito en la sección M, como doble comprobación del análisis.
2. Si la muestra de la posición D1 presenta un valor de M/Co superior a 1,1 y la muestra de la posición E1 presenta un valor de M/Co también superior a 1,1, la muestra se considera como un **falso positivo**. La reactividad de la muestra no es dependiente de la presencia específica de antígeno HDV y se ha producido una reacción cruzada con el anticuerpo policlonal marcado con HRP.
3. Si la muestra de la posición D1 presenta un valor de M/Co superior a 1,1 y la muestra de la posición E1 presenta un valor de M/Co inferior a 0,9, la muestra se considera como un **verdadero positivo**. La reactividad de la muestra es dependiente de la presencia específica de antígeno HDV y no es debida a ninguna reacción cruzada.

En la tabla siguiente se indica la interpretación de los resultados:

Pocillo	M/Co	M/Co	M/Co
D1	< 0,9	> 1,1	> 1,1
E1	< 0,9	> 1,1	< 0,9
Interpretación	Problema de contaminación	Falso positivo	Verdadero positivo

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
3. Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991
4. Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993
5. Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140-141, 1990
6. Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991
7. Forbes B.A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991
8. Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989
9. Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986
10. Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988
11. Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983
12. Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128, 1980
13. Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988
14. Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986
15. Grebenchtchiklov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2):219-231, 2002
16. Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550-561, 1998

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Producido por  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes s.r.l.  
Via G. Carducci n°27 - Sesto San Giovanni (Mi) - Italia



**INDICACION AL CONSUMIDOR**

Por cualquier información puede consultar al siguiente teléfono (011) 47713783 en el horario de 9,00 a 18,00 de Lunes a Viernes Personal de BIOARS S.A. estará a su disposición.  
La mercadería viaja por cuenta y riesgo del destinatario. Todo reclamo será atendido según lo provee el "Manual de procedimiento para reclamos técnicos y devolución de mercadería" que BIOARS S.A. pone a disposición del Cliente.

Establecimiento Elaborador: Dia Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l. Via G Carducci, n° 27, 20099, Sesto San Giovanni, Milán, Italia  
Establecimiento Importador: BIOARS S.A. - Santo Domingo 2578/80 Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Director Técnico: Dra. Claudia E. Eichevès - Bioquímica - Matrícula Nacional N° 7028 Autorizado Ministerio de Salud N°

*[Handwritten signature]*

BIOARS S.A.  
DIRECTOR GENERAL



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE  
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-9168/14-9

Se autoriza a la firma BIOARS S.A. a importar y comercializar el Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado 1) HDV Ab (total antibody) / ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA) para la determinación de anticuerpos frente al virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos; 2) HDV Ag/ ensayo inmunoenzimático de tercera generación (ELISA) para la determinación del Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos; 3) HDV IgM / ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de la clase IgM frente al virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos . Envases conteniendo: 1) Mircoplaca (MICROPLACA), Control Negativo (CONTROL -: 2ml), Control Positivo (CONTROL +: 2 ml), Calibrador (CAL: liofilizado), tampón de lavado concentrado (WASHBUF 20X: 60ml), Enzima Conjugada (CONJ: 16ml), Cromógeno / Sustrato (SUBS TMB: 16ml) y Ácido Sulfúrico (H2SO4 0,3M: 15ml); 2) Mircoplaca (MICROPLACA), Control Negativo (CONTROL -: 2ml), Control Positivo (CONTROL +: 2 ml), Calibrador (CAL: liofilizado), tampón de lavado concentrado (WASHBUF 20X: 60ml), Enzima Conjugada (CONJ: 16ml), Cromógeno / Sustrato (SUBS TMB: 16ml), Diluyente de muestras (DILSPE: 16ml) y Ácido Sulfúrico (H2SO4 0,3M: 15ml); y 3) Mircoplaca (MICROPLACA), Control Negativo (CONTROL -: 2ml), Control Positivo (CONTROL +: 2 ml), Calibrador (CAL: liofilizado), tampón de lavado concentrado (WASHBUF 20X: 60ml), Enzima Conjugada (CONJ 20X: 0.8ml),

Antígeno HDV (Ag HDV: 6 viales liofilizados), Diluyente de Antígeno HDV (Ag DIL: 16ml), Cromógeno / Sustrato (SUBS TMB: 16ml), Diluyente de muestras (DILSPE: 2 X 60ml) y Ácido Sulfúrico (H2SO4 0,3M: 15ml). Vida útil: QUINCE (15) MESES desde la fecha de elaboración, conservados entre 2 y 8°C. Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley Nº 16.463 y Resolución Ministerial Nº 145/98. Lugar de elaboración: DIA.PRO Diagnostic Bioprobes S.r.l. Via G. Carducci, 27-20099- Sesto San Giovanni, Milan (ITALIA). En las etiquetas de los envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado nº **008275**

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA

Buenos Aires, **12 JUN 2015**

Ing. ROGELIO LÓPEZ  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.

Firma y sello