

BIOLISA ANTI HBs

REF K121
INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação quantitativa de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (anti-HBs) em amostras biológicas de soro ou plasma, através de teste de enzimmunoensaio. Somente para uso de diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimmunoensaio ou imunoenzimático
O kit Biolisa Anti HBs é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio “sanduíche” para a detecção quantitativa de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (anti-HBs) em amostras humanas de soro ou plasma. A microplaca é revestida com antígenos de superfície específicos do vírus da hepatite B (HBs). No primeiro momento, a amostra é incubada junto ao conjugado, constituído de antígenos HBs específicos conjugados à peroxidase. Anticorpos anti-HBs, presentes na amostra, se ligam aos antígenos HBs específicos imobilizados na placa e nos antígenos HBs específicos presentes no conjugado, formando imunocomplexos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Em seguida, o substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul que indica a detecção de anticorpos anti-HBs na amostra. A solução de parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança de cor de azul para amarelo, medido em um leitor de microplaca.

REAGENTES

1- Padrões Referência (A - E) - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Cinco (5) frascos de Padrões Referência (A - E), contendo anticorpos anti-HBs em diferentes concentrações, solução tampão, estabilizantes, conservantes, surfactante e corante. **As concentrações variam a cada lote (de 0 a 500 mUI/mL), vide rótulo dos frascos. Potencialmente infectante.**
2- Conjugado - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão contendo antígenos de superfície específicos do vírus da hepatite B ligados à Peroxidase, estabilizantes, conservantes, surfactante e corante.
3- Placa Sensibilizada - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Placa sensibilizada com antígenos de superfície específicos para o vírus da Hepatite B.
4- Lavagem Concentrada - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.
5- Substrato - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução tampão contendo Peróxido de Ureia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.
6- Solução de Parada - Conservar entre 2 e 8°C. Ácido Sulfúrico 1N.
7- Seladores de Placa

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Padrões Referência (A-E)	5 Frascos x 1 mL	10 Frascos x 1 mL	25 Frascos x 1 mL
2- Conjugado	1 Frasco x 6 mL	2 Frascos x 6 mL	5 Frascos x 6 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
4- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	2 Frascos x 50 mL	5 Frascos x 50 mL
5- Substrato	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
6- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	2 Frascos x 12 mL
7- Seladores de Placa	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior

Materiais necessários, não contidos nos kit:

1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5 a 500 mL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 300 mL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).
3- Lavadora de microplaca.
4- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
5- Papel absorvente para secar as microcavidades.
6- Cronômetro ou relógio.
7- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluição.
8- Água destilada ou deionizada.
9- Ferramentas de Controle de Qualidade.
10- Incubadora de 37 °C ± 2 °C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C. O transporte em temperaturas até 30 °C não deverá exceder 5 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.
2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
3- O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8 °C.
4- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.
5- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados.
6- A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.
7- Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
9- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.
10- Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.
11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.
12- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
13- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.
14- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
15- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Soro ou Plasma (EDTA ou Heparina)

Amostras hemolisadas e altamente lipêmicas não devem ser usadas. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20 °C. Amostras de plasma armazenadas por períodos superiores ao preconizado e amostras coletadas com outros anticoagulantes diferentes dos citados, não devem ser utilizadas.

Podem ser obtidos valores diminuídos de concentração de anti-HBs em amostras de plasma colhidas em EDTA e Heparina, em comparação com as amostras de soro.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO
Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit Biolisa Anti HBs é estável após aberto por até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do Reagente N° 4 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 °C por até 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

Substrato

O Substrato é pronto para o uso.

TÉCNICA

Para uso em equipamentos automáticos, consulte ao SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente).

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, Controles e Amostras para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30°C) por no mínimo 40 minutos.

1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Padrões de Referência (de A até E) e Amostras. Recomenda-se testar em duplicata. Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.
2 - Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
3- Pipetar 50 µL de cada um dos Padrões Referência (A-E) e das Amostras nas cavidades previamente determinadas.
4- Pipetar 50 µL do Conjugado em todas as cavidades, **exceto** na cavidade do Branco.
5- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placas.
6- Incubar por 60 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
7- Retirar o selador das cavidades.
8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração em uma Lavadora de Microplacas. Usar aproximadamente 500 µL de Solução de Lavagem, previamente preparada, e efetuar um total de seis (6) ciclos de lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.
Nota: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.
9- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.
10- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
11- Incubar por 15 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
12- Retirar o selador das cavidades.
13- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.
14- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
15- Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco e dos Padrões de Referência estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Branco	< 0,100
Padrão Referência A	< 0,100
Padrão Referência B	Entre 0,050 e 0,200
Padrão Referência C	> B e < D
Padrão Referência D	> C e < E
Padrão Referência E	> 1,500

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica

CÁLCULOS

Uma curva de calibração é usada para determinar a concentração de anti-HBs em amostras desconhecidas.

Preparo da Curva de Calibração

Caso tenham sido realizadas em duplicata, calcular as médias das absorbâncias obtidas na leitora de microplaca de cada um dos Padrões de Referência (A-E), como no exemplo:

PADRÃO REFERÊNCIA	CONCENTRAÇÃO (VIDE RÓTULO)	ABSORBÂNCIA	ABSORBÂNCIA MÉDIA
A	0,0 mUI/mL	0,020	0,024 mUI/mL
		0,028	
B	10,0 mUI/mL	0,083	0,082 mUI/mL
		0,081	
C	100,0 mUI/mL	0,512	0,525 mUI/mL
		0,538	
D	300,0 mUI/mL	1,331	1,337 mUI/mL
		1,343	
E	500,0 mUI/mL	2,248	2,271 mUI/mL
		2,294	

Plotar as absorbâncias médias de cada Padrão Referência (A-E) versus a concentração correspondente em mUI/mL em papel milimetrado ou através de programas de computador. Traçar a curva ponto a ponto.

Cálculo da Concentração de anti-HBs das Amostras

Calcular a concentração de cada amostra analisada a partir da Curva de Calibração feita no papel milimetrado, interpolando o valor de absorbância obtida na leitura da amostra com o valor em concentração (mUI/mL) correspondente. O cálculo da concentração das amostras testadas também pode ser realizado utilizando programas adequados de computador, através de regressão linear.

O intervalo de medição do kit situa-se entre 2 e 500 mUI/mL (sensibilidade analítica e ponto máximo da curva, respectivamente). Resultados situados abaixo do limite inferior de detecção devem ser expressas como < 2 mUI/mL. Resultados situados acima do limite superior de detecção devem ser expressas como > 500 mUI/mL. Amostras que apresentarem valores maiores do que o último ponto da curva podem ser diluídas e reanalisadas, conforme descrito abaixo.

Diluição de Amostras

Amostras com concentração > 500,0 mUI/mL podem ser diluídas com cloreto de sódio 0,9% na proporção de 1:10 e reanalisadas. Para tanto, adicione 10 µL de amostra em 90 µL de cloreto de sódio 0,9%. A concentração obtida da amostra diluída deve ser multiplicada pelo fator de diluição (se diluída 1:10, multiplicar por 10). Se a concentração da amostra diluída for menor que o ponto de corte (10 mUI/mL), deve-se fazer uma diluição menor. Se a concentração da amostra ainda for maior que 500 mUI/mL, uma diluição maior deve ser realizada.

Notas:

- 1- Os dados apresentados são apenas para ilustração e não podem ser usados em substituição à curva de calibração, que deve ser construída no laboratório. Os Padrões Referência devem ser sempre testados a cada novo ensaio.
- 2- Devido à diversidade de antígenos disponíveis utilizados na fabricação de cada teste, as concentrações de anticorpos anti-HBs podem apresentar variação entre diferentes fabricantes de imunoenaios.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Conforme a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a quantificação de anti-HBs em amostras de indivíduos vacinados ou infectados com o vírus da hepatite B, é preconizado como ponto de corte a concentração de 10 UI/L (ou 10 mUI/mL). Dessa forma, após o cálculo da concentração de anti-HBs das amostras, considerar os valores abaixo para determinação de resultados qualitativos.

Resultado	QUALITATIVO
	Concentração de anti-HBs
Negativo (Não Reagente)	< 10,0 mUI/mL
Positivo (Reagente)	> 10,0 mUI/mL

Nota: No caso de resultado entre 9 e 11 mUI/mL, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente entre 9 e 11 mUI/mL devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados se confirmarem, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnostico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação, antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo da doença.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada por Triglicérides 1500 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL. Altas concentrações de Fator Reumatóide (acima de 500 UI/mL) podem interferir no resultado obtido em amostras em que a concentração de anti-HBs se encontra perto do ponto de corte (10 mUI/mL). Amostras de plasma armazenadas por períodos superiores ao preconizado (30 dias) podem apresentar fibrina e precipitação de fibronectina que podem interferir no teste. Amostras de plasma colhidas em EDTA e Heparina podem ser utilizadas no produto, mas podem ser obtidos valores diminuídos de concentração de anti-HBs em comparação com soro.

REATIVIDADE CRUZADA

Um estudo de reatividade cruzada foi realizado, avaliando 75 amostras de soro e plasma negativas para anti-HBs, mas positivas para outras infecções. Dentre elas, 5 amostras positivas para HIV, 5 amostras positivas para HCV, 5 amostras positivas para HSV, 5 amostras positivas para COVID-19, 5 amostras positivas para Dengue, 10 amostras positivas para Rubéola, 15 amostras positivas para CMV, 5 amostras positivas para Doenças de Chagas, 5 amostras positivas para Sífilis e 15 amostras positivas para Toxoplasmose. Não foram observados resultados falsos positivos para os patógenos listados. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de outras reatividades cruzadas. O diagnóstico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

DESEMPENHO DO PRODUTO
PRECISÃO

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPETIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	1,750	0,375	0,034
Desvio Padrão	0,075	0,025	0,005
Coefficiente de Variação (%)	4,31	6,69	14,42

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPRODUTIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	1,715	0,368	0,033
Desvio Padrão	0,144	0,039	0,005
Coefficiente de Variação (%)	8,41	10,58	15,13

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A sensibilidade analítica do kit Biolisa Anti HBs é 2 mUI/mL.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit Biolisa Anti HBs foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de referência. Os resultados mostram que o kit Biolisa Anti HBs possui sensibilidade clínica de 95,0% e especificidade clínica de 99,2%.

		RESULTADO REFERÊNCIA		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA ANTI HBS	Positivo	115	1	116
	Negativo	6	121	127
	Total	121	122	243

Sensibilidade Clínica: 95,0% (115/121) - IC 95%: 89,5 – 98,2%

Especificidade Clínica: 99,2% (121/122) - IC 95%: 95,5 – 99,9%

LINEARIDADE

A reação é linear até a concentração do ponto mais alto da curva de calibração. Para amostras com valores superiores, deve-se diluir a amostras conforme descrito em "Diluição de Amostras", repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

EFEITO PRÓ-ZONA DE ALTA DOSE

Não foi observado efeito pró-zona de alta dose até a concentração de 6.300 mUI/mL de anti-HBs. Entretanto, pode ser observada uma redução de absorbância a partir da concentração de 12.500 mUI/mL. Ainda, devido a um efeito de pró-zona de alta dose, amostras com concentração de anti-HBs ≥ 100.000 mUI/mL podem resultar em resultados menores que o limite superior de medição (500 mUI/mL).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A hepatite B é uma infecção causada pelo vírus da hepatite B (HBV), considerada um problema de saúde pública, responsável por uma variedade de doenças do fígado, de formas agudas a crônicas, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular. Em 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 296 milhões de pessoas viviam com o vírus em todo o mundo, com 1,5 milhões de novas infecções e mais de 800.000 mortes por ano. A hepatite B é transmitida através do contato sexual, exposição de sangue, transmissão de mãe para filho durante o parto ou compartilhamento de objetos perfurocortantes. Em alguns casos, o vírus pode persistir por toda a vida. O HBV pertence à família Hepadnaviridae e possui um nucleocapsídeo proteico (proteína core), envolvendo um material genético de DNA de fita dupla. O vírus é envolto por um envelope lipoproteico contendo proteínas de superfície (HBsAg), um dos primeiros marcadores que aparecem no sangue após a infecção com o vírus da Hepatite B. A resposta imune à infecção pelo HBV inclui o desenvolvimento de anticorpos específicos para o HBsAg, chamados de anti-HBs. Estes anticorpos aparecem poucas semanas após o HBsAg ser detectado no sangue, e estão associados com a recuperação da infecção. Estes anticorpos também aparecem após o processo de imunização por meio de vacinas para hepatite B. Portanto, a detecção e monitoração de anticorpos contra o HBsAg tornou-se uma importante ferramenta na triagem e no acompanhamento dos indivíduos infectados, bem como um indicador de sucesso dos vacinados contra o HBV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR.
- 2- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 3- Frank Fenner and David O. White, Medical Virology, 4th Edition, Academic Press, 1994.
- 4- Richman, D., R. Whitley, F. Hayden. Clinical Virology. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997.
- 5- WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing. February 2017.
- 6- WHO. Guidelines for the Prevention, Care and Tretatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection. March 2015.
- 7- WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-first report. 2013.
- 8- WHO. Hepatitis B Fact Sheets. Atualizado em 2021.
- 9- Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília, 2017.
- 10- Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais. Brasília, 2018.
- 11- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

 QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do kit BIOLISA Anti HBs na ANVISA: 10269360289

Revisão: Agosto/2024

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÁMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERILIZADO
	CUIDADO		PERIGO

BIOLISA ANTI HBs

[REF] K121

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cuantitativa de anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs) en muestras biológicas de suero o plasma, mediante la prueba de inmunoensayo enzimático. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Inmunoensayo enzimático o inmunoenzimatico

El kit Biolisa Anti HBs es un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el principio de "sándwich" para la detección cuantitativa de anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs) en muestras de suero o plasma humano. La microplaca está recubierta con antígenos de superficie específicos (HBs) del virus de la hepatitis B. En un primer momento, la muestra se incuba con el conjugado, formado por antígenos HBs específicos conjugados con peroxidasa. Los anticuerpos anti-HBs presentes en la muestra se unen a los antígenos HBs específicos inmovilizados en la placa ya los antígenos HBs específicos presentes en el conjugado, formando inmunocomplejos. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Luego se agrega el sustrato y se incuba, produciendo un color azul que indica la detección de anticuerpos anti-HBs en la muestra. Se agrega solución de parada para detener la reacción, con un cambio de color de azul a amarillo, medido en un lector de microplacas.

REACTIVOS

- 1- Estándares de Referencia (A – E)** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Cinco (5) viales de Estándares de Referencia (A - E), que contienen anticuerpos anti-HBs en diferentes concentraciones, Solución Tampón, estabilizantes, conservantes, surfactante y colorante. **Las concentraciones varían de un lote a otro (de 0 a 500 mUI/mL), consulte la etiqueta del vial. Potencialmente infeccioso.**
- 2- Conjugado** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón que contiene antígenos de superficie específicos del virus de la Hepatitis B unidos a Peroxidasa, estabilizadores, conservantes, surfactante y colorante.
- 3- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Placa sensibilizada con antígenos de superficie específicos para el virus de la Hepatitis B.
- 4- Lavado Concentrado** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloruro de Potasio < 100 mmol/L, Cloruro de Sodio < 5 mol/L), tensioactivo y conservante.
- 5- Sustrato** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón que contiene Peróxido de Urea, Tetrametilbenzidina (TMB) y conservante.
- 6- Solución de Parada** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Ácido Sulfúrico 1N.
- 7- Selladores de Placa**

PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Estándares de Referencia (A – E)	5 Viales x 1 mL	10 Viales x 1 mL	25 Viales x 1 mL
2- Conjugado	1 Vial x 6 mL	2 Viales x 6 mL	5 Viales x 6 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
4- Lavado Concentrado	1 Vial x 50 mL	2 Viales x 50 mL	5 Viales x 50 mL
5- Sustrato	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	5 Viales x 12 mL
6- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	2 Viales x 12 mL
7- Selladores de Placa	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades

EQUIPOS E INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el ítem anterior.

Materiales necesarios, no contenidos en los kit:

- 1-** Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 5 a 500 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
- 2-** Repetidor para pipeteo repetitivo de volúmenes de 300 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
- 3-** Lavadora de microplacas.
- 4-** Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 630 nm de longitud de onda.
- 5-** Papel absorbente para secar los pozos.
- 6-** Cronómetro o reloj.
- 7-** Vial para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
- 8-** Agua destilada o desionizada.
- 9-** Herramientas de Control de Calidad.
- 10-** Incubadora a 37 °C ± 2 °C.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento debe ser de 2 y 8 °C. El transporte a temperaturas de hasta 30 °C no debe excteder los 5 días. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro*.

- 2-** Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados exactos.
- 3-** El sobre que contiene la microplaca debe abrirse solo después de alcanzar la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de micropocillos no utilizadas en el sobre, ciérrelo y guárdelo entre 2 y 8 °C.
- 4-** El agua utilizada para limpiar el material debe ser fresca y libre de contaminantes.
- 5-** Las columnas desionizantes saturadas liberan agua alcalina, varios iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.
- 6-** La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manipúlelo con el debido cuidado.
- 7-** Toda la materia prima del producto está probada y debe ser no reactiva para HBsAg, Anti-HIV 1&2 y Anti-HCV. Sin embargo, estas pruebas no ofrecen una seguridad completa en ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga suero es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por tanto, es necesario cuidar la bioseguridad en el manejo de estos productos.
- 8-** Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia en el tiempo de reacción entre los pocillos.
- 9-** Como medida de protección, la placa debe cubrirse durante la reacción.
- 10-** Asegúrese de que el fondo de la cavidad esté limpio y seco y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante la prueba.
- 11-** No exponga los reactivos, especialmente el sustrato, a luz fuerte o vapores de hipoclorito durante los pasos de almacenamiento o incubación.
- 12-** Recomendamos aplicar las normas de protección ambiental locales, estatales y federales para que la eliminación de reactivos y material biológico se realice de acuerdo con la legislación vigente.
- 13-** Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consultar la HDS (Hoja de Datos de Seguridad) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o a solicitud del Cliente SAC (Servicio de Asistencia al Cliente) de Quibasa.
- 14-** No utilice el producto en caso de daños en el embalaje.
- 15-** Es fundamental que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a un mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Soro o Plasma (EDTA o Heparina)

No se deben utilizar muestras hemolizadas y altamente lipémicas. Las muestras se pueden almacenar en refrigeración, entre 2 y 8 °C, por un período máximo de 5 días. Si las muestras no se pueden analizar en 5 días, se pueden almacenar hasta 30 días a -20 °C. No se deben utilizar muestras de plasma almacenadas durante períodos más largos de los recomendados ni muestras recogidas con anticoagulantes distintos de los mencionados.

Se pueden obtener valores de concentración de anti-HBs disminuidos en muestras de plasma recolectadas en EDTA y Heparina en comparación con las muestras de suero.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit Biolisa Anti HBs es estable después de haber sido abierto hasta por 30 días. Esta estabilidad puede variar según las condiciones de prueba y el entorno. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando controles internos del kit y los criterios para validar la técnica.

PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado

Diluir el contenido del reactivo N° 4 (Lavado Concentrado) en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Una vez preparada, la solución puede almacenarse entre 2 y 30 °C hasta por 30 días. Si se produce la cristalización, calentar a 37 °C hasta que se disuelva.

Sustrato

El sustrato está listo para su uso.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos, consultar al Servicio de Atención al Cliente (SAC).

Antes de iniciar el ensayo, deje que todos los reactivos, muestras y controles se establezcan a temperatura ambiente (15-30 °C) durante al menos 40 minutos.

- 1-** Separar las cavidades a utilizar considerando: Estándares de Referencia (de A a E) y Muestras. Se recomienda probar por duplicado. Devuelva las tiras de microplacas no utilizadas al embalaje sellada original.
- 2 -** Separar la primera cavidad para el Blanco (OPCIONAL).
- 3-** Pipetear 50 µL de cada uno de los Estándares de Referencia (A-E) y Muestras en los pocillos previamente determinados.
- 4-** Pipetear 50 µL de Conjugado en todos los pocillos, **excepto** en el pocillo del Blanco.
- 5-** Homogeneizar suavemente durante ± 10 segundos. Cubrir los pocillos con sellador de placas.
- 6-** Incubar durante 60 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 7-** Retire el sellador de las cavidades.
- 8-** Desechar el contenido de los pocillos por aspiración en un Lavador de Microplacas. Utilice aproximadamente 500 µL de solución de lavado previamente preparada y realice un total de seis (6) ciclos de lavado. Para asegurar el secado de la placa, al final del lavado, golpee la placa durante unos segundos sobre papel absorbente.
- Nota:** Un lavado/secado deficiente puede causar malos resultados.
- 9-** Pipetear 100 µL de Sustrato en todos los pocillos, incluido el pocillo del Blanco.
- 10-** Homogeneizar suavemente durante ± 10 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
- 11-** Incubar durante 15 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 12-** Retire el sellador de las cavidades.
- 13-** Pipetear 100 µL de solución de parada en todos los pocillos, incluido el pocillo en blanco.
- 14-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.
- 15-** Lectura con doble filtro: 450 nm / 630 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Compruebe si los resultados obtenidos para la lectura del Blanco y los Estándares de Referencia son compatibles con los valores que se presentan abajo:

ITEM	ABSORBÁNCIAS
Blanco	< 0,100
Estándar de Referencia A	< 0,100
Estándar de Referencia B	Entre 0,050 y 0,200
Estándar de Referencia C	> B y < D
Estándar de Referencia D	> C y < E
Estándar de Referencia E	> 1,500

Si los valores están fuera de los valores esperados, la técnica debe repetirse.

CÁLCULOS

Se utiliza una curva de calibración para determinar la concentración de anti-HBs en muestras desconocidas.

Preparo de la Curva de Calibración

Si se realizaron por duplicado, calcular los promedios de las absorbancias obtenidas del lector de microplacas de cada uno de los Estándares de Referencia (A-E), como en el ejemplo:

ESTÁNDAR DE REFERENCIA	CONCENTRACIÓN (VER ETIQUETA)	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA PROMEDIO
A	0,0 mUI/mL	0,020	0,024 mUI/mL
		0,028	
B	10,0 mUI/mL	0,083	0,082 mUI/mL
		0,081	
C	100,0 mUI/mL	0,512	0,525 mUI/mL
		0,538	
D	300,0 mUI/mL	1,331	1,337 mUI/mL
		1,343	
E	500,0 mUI/mL	2,248	2,271 mUI/mL
		2,294	

Grafiqué las absorbancias promedio de cada Estándar de Referencia (A-E) frente a la concentración correspondiente en mUI/mL en papel cuadrículado o a través de programas de computadora. Traza la curva punto por punto.

Cálculo de la Concentración de Anti-HBs de las Muestras

Calcular la concentración de cada muestra analizada a partir de la Curva de Calibración realizada en el papel cuadrículado, interpolando el valor de absorbancia obtenido de la lectura de la muestra con el valor de concentración correspondiente (mUI/mL). El cálculo de la concentración de las muestras analizadas también se puede realizar utilizando programas informáticos adecuados, mediante regresión lineal.

El rango de medición del kit está entre 2 y 500 mUI/mL (sensibilidad analítica y punto máximo de la curva, respectivamente). Los resultados por debajo del límite inferior de detección deben expresarse como < 2 mUI/mL. Los resultados por encima del límite superior de detección deben expresarse como > 500 mUI/mL. Las muestras que presenten valores superiores al último punto de la curva se pueden diluir y volver a analizar, como se describe a continuación.

Dilución de las Muestras

Las muestras con una concentración > 500,0 mUI/mL se pueden diluir con cloruro de sodio al 0,9% en una proporción de 1:10 y volver a analizar. Para ello, añada 10 µL de muestra a 90 µL de cloruro de sodio al 0,9%. La concentración obtenida de la muestra diluida debe multiplicarse por el factor de dilución (si se diluye 1:10, multiplicar por 10). Si la concentración de la muestra diluida es inferior al punto de corte (10 mUI/mL), se debe realizar una dilución menor. Si la concentración de la muestra sigue siendo superior a 500 mUI/mL, se debe realizar una dilución mayor.

Notas:

1- Los datos presentados son solo ilustrativos y no pueden ser utilizados como sustituto de la curva de calibración, que debe construirse en el laboratorio. Los Estándares de Referencia siempre deben probarse con cada nuevo ensayo.
2- Debido a la diversidad de antígenos disponibles utilizados en la fabricación de cada prueba, las concentraciones de anticuerpos anti-HBs pueden variar entre diferentes fabricantes de inmunoensayo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

De acuerdo con la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la cuantificación de anti-HBs en muestras de individuos vacunados o infectados con el virus de la hepatitis B, se recomienda una concentración de 10 UI/L (o 10 mUI/L) como punto de corte. Por lo tanto, después de calcular la concentración de anti-HBs en las muestras, considere los valores a continuación para determinar resultados cualitativos.

Resultado	CUALITATIVO
	Concentración de anti-HBs
Negativo (No Reactivo)	< 10,0 mUI/mL
Positivo (Reactivo)	> 10,0 mUI/mL

Nota: En el caso de un resultado entre 9 y 11 mUI/mL, la muestra debe volver a analizarse. Las muestras que obtienen repetidamente resultados entre 9 y 11 mUI/mL deben volver a analizarse con un método alternativo. Si se confirman los resultados, se debe recolectar una nueva muestra en dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recogida. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable y no son el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La interpretación de una prueba de diagnóstico no debe establecerse sobre la base de una sola prueba. Se deben incluir otras pruebas de confirmación antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible, antes del diagnóstico descriptivo de la enfermedad.

INTERFERENTES

No se observó interferencia para Triglicéridos 1500 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albúmina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL y anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL. Concentraciones elevadas de Factor Reumatoideo (superiores a 500 UI/mL) pueden interferir en el resultado obtenido en muestras donde la concentración de anti-HBs está próxima al punto de corte (10 mUI/mL). Las muestras de plasma almacenadas durante períodos más largos de lo recomendado (30 días) pueden mostrar precipitación de fibrina y fibronectina que pueden interferir con la prueba. Las muestras de plasma recogidas en EDTA y heparina se pueden utilizar en el producto, pero se pueden obtener valores reducidos de concentración de anti-HBs en comparación con el suero.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio de reactividad cruzada, evaluando 75 muestras de suero y plasma negativas para anti-HBs, pero positivas para otras infecciones. Entre ellos, 5 muestras positivas para HIV, 5 muestras positivas para HCV, 5 muestras positivas para HSV, 5 muestras positivas para COVID-19, 5 muestras positivas para Dengue, 10 muestras positivas para Rubéola, 15 muestras positivas para CMV, 5 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 5 muestras positivas para Sífilis y 15 muestras positivas para Toxoplasmosis. No se observaron resultados falsos positivos para los patógenos enumerados. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de otras reactividades cruzadas. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa de control de calidad interno, donde se establezcan claramente los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a variaciones. Es importante señalar que todos los sistemas de medición tienen una variabilidad analítica característica, que debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para eso, se recomienda utilizar controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las dosificaciones.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad

La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con diferentes valores, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

REPETIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	1,750	0,375	0,034
Desvío Patrón	0,075	0,025	0,005
Coefficiente de Variación (%)	4,31	6,69	14,42

Reproductibilidad

La reproducibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con diferentes valores, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

REPRODUCTIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	1,715	0,368	0,033
Desvío Patrón	0,144	0,039	0,005
Coefficiente de Variación (%)	8,41	10,58	15,13

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica do kit Biolisa Anti HBs es 2 mUI/mL.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

El kit Biolisa Anti HBs se utilizó para el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas por otro método de referencia. Los resultados muestran que el kit Biolisa Anti HBs tiene una sensibilidad clínica del 95,0% y una especificidad clínica del 99,2%.

		RESULTADO REFERÊNCIA		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA ANTI HBS	Positivo	115	1	116
	Negativo	6	121	127
	Total	121	122	243

Sensibilidad Clínica: 95,0% (115/121) - IC 95%: 89,5 – 98,2%

Especificidad Clínica: 99,2% (121/122) - IC 95%: 95,5 – 99,9%

LINEARIDAD

La reacción es lineal hasta la concentración en el punto más alto de la curva de calibración. Para muestras con valores superiores, las muestras deben diluirse como se describe en “Dilución de las Muestras”, repetir la dosificación y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.

EFFECTO PRO-ZONA DE DOSIS ALTAS

No se observó efecto pro-zona a dosis altas hasta una concentración de 6.300 mUI/mL de anti-HBs. Sin embargo, se puede observar una reducción en la absorbancia a partir de una concentración de 12.500 mUI/mL. Además, debido a un efecto de pro-zona de dosis altas, las muestras con una concentración de anti-HBs ≥100.000 mUI/mL pueden generar resultados inferiores al límite de medición superior (500 mUI/mL).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

La hepatitis B es una infección causada por el virus de la hepatitis B (HBV), considerada un problema de salud pública, responsable de una variedad de enfermedades hepáticas, desde formas agudas hasta crónicas, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular. En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 296 millones de personas vivían con el virus en todo el mundo, con 1,5 millones de nuevas infecciones y más de 800.000 muertes cada año. La hepatitis B se transmite a través del contacto sexual, la exposición a la sangre, la transmisión de madre a hijo durante el parto o el intercambio de objetos punzocortantes. En algunos casos, el virus puede persistir durante toda la vida. El HBV pertenece a la familia Hepadnaviridae y tiene una proteína nucleocápside (proteína central), que involucra un material genético de DNA de doble cadena. El virus está envuelto en una envoltura de lipoproteína que contiene proteínas de superficie (HBsAg), uno de los primeros marcadores que aparecen en la sangre después de la infección por el virus de la hepatitis B. La respuesta inmunitaria a la infección por HBV incluye el desarrollo de anticuerpos específicos contra el HBsAg, llamados anti-HBs. Estos anticuerpos aparecen unas pocas semanas después de que se detecta HBsAg en la sangre y están asociados con la recuperación de la infección. Estos anticuerpos también aparecen tras el proceso de inmunización a través de las vacunas contra la hepatitis B. Por ello, la detección y seguimiento de anticuerpos frente al HBsAg se ha convertido en una herramienta importante en el cribado y seguimiento de los individuos infectados, así como en un indicador de éxito de los vacunados frente a HBV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44. 2017 AACR.
- 2- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 3- Frank Fenner and David O. White, Medical Virology, 4th Edition, Academic Press, 1994.
- 4- Richman, D., R. Whitley, F. Hayden. Clinical Virology. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997.
- 5- WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing. February 2017.
- 6- WHO. Guidelínes for the Prevention, Care and Tretatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection. March 2015.
- 7- WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-first report. 2013.
- 8- WHO. Hepatitis B Fact Sheets. Atualizado em 2021.
- 9- Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília, 2017.
- 10- Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais. Brasília, 2018.
- 11- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberado para el consumo, todos los reactivos **Bioclin** son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validez mencionada en el embalaje de presentacion, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente
Tel.: 0800 0315454 |E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro del kit Biolisa Anti HBs en la ANVISA: 10269360289

Revisión: Agosto/2024

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)		CONTROL NEGATIVO
	LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)		RIESGO BIOLÓGICO
	EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA		INFLAMABLE
	VER INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTÁ DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

BIOLISA ANTI HBs

REF: K121

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION

Test for the quantitative determination of antibodies against the surface antigen of the hepatitis B virus (anti-HBs) in biological samples of serum or plasma, through the enzyme immunoassay test. For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic
The Biolisa Anti HBs kit is a solid-phase enzyme immunoassay based on the “sandwich” principle for the quantitative detection of antibodies against hepatitis B virus surface antigen (anti-HBs) in human serum or plasma samples. The microplate is coated with hepatitis B virus specific surface antigens (HBs). At first, the sample is incubated with the conjugate, made up of specific HBs antigens conjugated to peroxidase. Anti-HBs antibodies present in the sample bind to the specific HBs antigens immobilized on the plate and to the specific HBs antigens present in the conjugate, forming immune complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Then the substrate is added and incubated, producing a blue color that indicates the detection of anti-HBs antibodies in the sample. Stop solution is added to stop the reaction, with a color change from blue to yellow, measured on a microplate reader.

REAGENTS

1- Reference Standard (A - E) - Store between 2 and 8 °C. Contains: Five (5) vials of Reference Standards (A - E), containing anti-HBs antibodies in different concentrations, buffer solution, stabilizers, preservatives, surfactant and dye. **Concentrations vary from batch to batch (from 0 to 500 mIU/mL), see vial label. Potentially infectious.**
2- Conjugate - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution containing Hepatitis B virus-specific surface antigens linked to Peroxidase, stabilizers, preservatives, surfactant and dye.
3- Sensitized Plate - Store between 2 and 8 °C. Contains: Plate sensitized with specific surface antigens for Hepatitis B virus.
4- Concentrated Washing - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.
5- Substrate - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
6- Stop Solution - Store between 2 and 8 °C. Contains: 1N Sulfuric Acid.
7- Plate Sealers

PRESENTATION

REAGENTS	1	2	3
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities
1- Reference Standards (A – E)	5 Vials x 1 mL	10 Vials x 1 mL	25 Vials x 1 mL
2- Conjugate	1 Vial x 6 mL	2 Vials x 6 mL	5 Vials x 6 mL
3- Sensitized Plate	1 Unit	2 Units	5 Units
4- Concentrated Washing	1 Vial x 50 mL	2 Vials x 50 mL	5 Vials x 50 mL
5- Substrate	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
6- Stop Solution	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	2 Vials x 12 mL
7- Plate Sealers	3 Units	6 Units	15 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials in the kit:

- Reagents described in the previous item.

Materials needed but not contained in the Kit:

1- Pipettes capable of dispensing volumes of 5 to 500 µL with a variation coefficient of less than 1.5%.
2- Repipettor for repetitive pipetting of volumes of 300 µL with coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
3- Microplate washer.
4- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm wavelength.
5- Absorbent paper to dry the wells.
6- Stopwatch or watch.
7- Vial to store the Washing Solution after dilution.
8- Distilled or deionized water.
9- Quality Control Tools.
10- Incubator at 37 °C ± 2 °C.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

Storage temperature should be between 2 and 8 °C. Transport at temperatures up to 30°C should not exceed 5 days. Keep out of the light and avoid humidity. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE

1- For *in vitro* diagnostic use only.
2- Strictly follow the proposed methodology to obtain exact results.
3- The sachet containing the microplate must be opened only after reaching room temperature. Replace the unused microwell strips in the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
4- The water used to clean the material must be fresh and free from contaminants.
5- Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
6- The Stop Solution contains Sulfuric Acid which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.
7- All raw material of the product is tested and must be non-reactive for HBsAg, Anti-HIV 1&2 and Anti-HCV. However, these tests do not offer complete security in the absence of infectious agents. The handling of any product that contains serum is potentially capable of transmitting disease. Therefore, it is necessary to take due care of biosafety in the handling of these products.
8- Pipette the reagents always in the same order to minimize the difference in reaction time between the wells.
9- As a protection measure, the plate must be covered during the reaction.
10- Make sure that the bottom of the cavity is clean and dry and that there are no bubbles on the liquid surface before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the test.
11- Do not expose the reagents, especially the Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation steps.
12- We recommend applying local, state and federal environmental protection standards so that the disposal of reagents and biological material is carried out in accordance with current legislation.
13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the SDS (Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Services Office) of Quibasa.
14- Do not use the product in case of damage to the packaging.
15- It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Serum or Plasma (EDTA or Heparin)

Hemolyzed and highly lipemic samples should not be used. The samples can be stored under refrigeration, between 2 and 8 °C, for a maximum period of 5 days. If samples cannot be analyzed within 5 days, they can be stored for up to 30 days at -20°C. Plasma samples stored for periods longer than recommended and samples collected with anticoagulants other than those mentioned should not be used.

Decreased anti-HBs concentration values can be obtained in plasma samples collected in EDTA and Heparin compared to serum samples.

DESCRIPTION OF PROCESS

Stability After Open

The results of the stability test show that the Biolisa Anti HBs kit is stable after being opened up to 30 days. This stability may vary according to the test conditions and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the performance of the product using internal controls of the kit and the criteria for validating the technique.

PREPARATION OF WORKING REAGENT

Washing Solution

Dilute the contents of Reagent N° 4 (Concentrated Washing) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored at 2 to 30 °C up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolved.

Substrate

The Substrate is ready for use.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult the Customer Service Department (SAC).

Before starting the assay, allow all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 – 30 °C) for at least 40 minutes.
1- Separate the cavities to be used considering: Reference Standards (from A to E) and Samples. It is recommended to test in duplicate. Return unused microplate strips to the original sealed package.
2 - Separate the first cavity for the Blank (OPTIONAL).
3- Pipette 50 µL of each of the Reference Standards (A-E) and Samples into the previously determined wells.
4- Pipette 50 µL of Conjugate into all wells, **except** for the Blank well.
5- Homogenize gently for ± 10 seconds. Cover the wells with plate sealer.
6- Incubate for 60 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
7- Remove the sealer from the cavities.
8- Discard the contents of the wells by aspiration in a Microplate Washer. Use approximately 500 µL of previously prepared Wash Solution and perform a total of six (6) wash cycles. To ensure plate drying, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
Note: Poor washing/drying may cause poor results.
9- Pipette 100 µL of Substrate into all wells, including the Blank well.
10- Homogenize gently for ± 10 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
11- Incubate for 15 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
12- Remove the sealer from the cavities.
13- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells, including the Blank well.
14- Homogenize gently for ± 30 seconds.
15- Read using double filter: 450 nm / 630 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Check if the results obtained for reading the Blank and Reference Standards are compatible with the values presented below:

ITEM	ABSORBANCES
Blank	< 0.100
Reference Standard A	< 0.100
Reference Standard B	Entre 0.050 y 0.200
Reference Standard C	> B y < D
Reference Standard D	> C y < E
Reference Standard E	> 1.500

If the values are outside the expected values, the technique should be repeated.

CALCULATIONS

A calibration curve is used to determine the concentration of Anti-HBs in unknown samples.

Preparation of Calibration Curve

If they were performed in duplicate, calculate the averages of the absorbances obtained from the microplate reader of each of the Reference Standards (A-E), as in the example:

REFERENCE STANDARD	CONCENTRATION (SEE LABEL)	ABSORBANCE	AVERAGE ABSORBANCE
A	0.0 mUI/mL	0.020	0.024 mUI/mL
		0.028	
B	10.0 mUI/mL	0.083	0.082 mUI/mL
		0.081	
C	100.0 mUI/mL	0.512	0.525 mUI/mL
		0.538	
D	300.0 mUI/mL	1.331	1.337 mUI/mL
		1.343	
E	500.0 mUI/mL	2.248	2.271 mUI/mL
		2.294	

Plot the average absorbance of each Reference Standard (A-E) versus the corresponding concentration in mIU/mL on graph paper or through computer programs. Trace the curve point by point.

Calculation of Anti-HBs Concentration of Samples

Calculate the concentration of each analyzed sample from the Calibration Curve made on millimeter paper, interpolating the absorbance value obtained from the sample reading with the corresponding concentration value (mUI/mL). The calculation of the concentration of the tested samples can also be performed using suitable computer programs, through linear regression.

The measurement range of the kit is between 2 and 500 mIU/mL (analytical sensitivity and maximum point of the curve, respectively). Results below the lower limit of detection should be expressed as < 2 mIU/mL. Results above the upper detection limit should be expressed as > 500 mIU/mL. Samples that present values greater than the last point on the curve can be diluted and reanalyzed, as described below.

Sample Dilution

Samples with a concentration > 500 mIU/mL can be diluted with 0.9% sodium chloride at a ratio of 1:10 and reanalyzed. To do so, add 10 µL of sample to 90 µL of 0.9% sodium chloride. The concentration obtained from the diluted sample must be multiplied by the dilution factor (if diluted 1:10, multiply by 10). If the concentration of the diluted sample is less than the cut-off point (10 mIU/mL), a smaller dilution should be made. If the sample concentration is still greater than 500 mIU/mL, a higher dilution should be performed.

Notes:

- 1- The data presented are for illustration purposes only and cannot be used as a substitute for the calibration curve, which must be constructed in the laboratory. Reference Standards should always be tested with each new assay.
- 2- Due to the diversity of available antigens used in the manufacture of each test, the concentrations of anti-HBs antibodies may vary between different immunoassay manufacturers.

INTERPRETATION OF RESULTS

According to the recommendation of the World Health Organization (WHO) for the quantification of anti-HBs in samples from individuals vaccinated or infected with the hepatitis B virus, a concentration of 10 IU/L (or 10 mIU/L) is recommended as a cut-off point. Thus, after calculating the concentration of anti-HBs in the samples, consider the values below to determine qualitative results.

Result	QUALITATIVE
	Anti-HBs Concentration
Negative (No Reactive)	< 10.0 mIU/mL
Positive (Reactive)	> 10.0 mIU/mL

Note: In the case of a result between 9 and 11 mIU/mL, the sample must be reanalyzed. Samples that repeatedly get results between 9 and 11 mIU/mL should be retested using an alternative method. If the results are confirmed, a new sample should be collected in two weeks. The result of the last sample collected must prevail. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional and are not the only criterion for determining the patient's diagnosis and/or treatment.

PROCESS LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be established on the basis of a single test. Other confirmatory tests must be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information, before the descriptive diagnosis of the disease.

INTERFERENTS

No interference was observed for Triglycerides 1500 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 2 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Acid Oxalic 60 mg/dL, C-Reactive Protein 41.2 mg/dL and anti-Streptolysin O 1023 IU/mL. High concentrations of Rheumatoid Factor (above 500 IU/mL) may interfere with the result obtained in samples where the concentration of anti-HBs is close to the cut-off point (10 mIU/mL). Plasma samples stored for periods longer than recommended (30 days) may show fibrin and fibronectin precipitation that may interfere with the test. Plasma samples collected in EDTA and Heparin can be used in the product, but decreased values of anti-HBs concentration compared to serum can be obtained.

CROSS REACTIVITY

A cross-reactivity study was performed, evaluating 75 serum and plasma samples negative for anti-HBs but positive for other infections. Among them, 5 samples positive for HIV, 5 samples positive for HCV, 5 samples positive for HSV, 5 samples positive for COVID-19, 5 samples positive for Dengue, 10 samples positive for Rubella, 15 samples positive for CMV, 5 samples positive for Chagas Disease, 5 samples positive for Syphilis and 15 samples positive for Toxoplasmosis. No false positive results were observed for the listed pathogens. Despite the results found, the possibility of other cross-reactivities cannot be completely ruled out. The final diagnosis should consider the patient's clinical data along with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to note that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. For that, it is recommended to use controls, which allow to evaluate the precision and accuracy of the dosages.

PRODUCT PERFORMANCE

PRECISION

Repeatability

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

REPEATABILITY	SAMPLE		
	1	2	3
Average	1.750	0.375	0.034
Standard Deviation	0.075	0.025	0.005
Coefficient of Variation (%)	4.31	6.69	14.42

Reproducibility

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

REPRODUCIBILITY	SAMPLE		
	1	2	3
Average	1.715	0.368	0.033
Standard Deviation	0.144	0.039	0.005
Coefficient of Variation (%)	8.41	10.58	15.13

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of the Biolisa Anti HBs kit is 2 mIU/mL.

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The Biolisa Anti HBs kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed by another reference method. The results show that the Biolisa Anti HBs kit has a clinical sensitivity of 95.0% and a clinical specificity of 99.2%.

		REFERENCE RESULT		
		Positive	Negative	Total
BIOLISA ANTI HBS	Positive	115	1	116
	Negative	6	121	127
	Total	121	122	243

Clinical Sensitivity: 95.0% (115/121) - IC 95%: 89.5 – 98.2%

Clinical Specificity: 99.2% (121/122) - IC 95%: 95.5 – 99.9%

LINEARITY

The reaction is linear up to the concentration at the highest point of the calibration curve. For samples with higher values, the samples must be diluted as described in "Sample Dilution", repeat the dosage and multiply the result obtained by the dilution factor.

HIGH DOSE HOOK EFFECT

No high-dose hook effect was observed up to a concentration of 6,300 mIU/mL of anti-HBs. However, a reduction in absorbance can be observed from a concentration of 12,500 mIU/mL. Also, due to a high-dose hook effect, samples with an anti-HBs concentration ≥ 100,000 mIU/mL may result in results lower than the upper measurement limit (500 mIU/mL).

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Hepatitis B is an infection caused by the hepatitis B virus (HBV), considered a public health problem, responsible for a variety of liver diseases, from acute to chronic forms, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In 2019, the World Health Organization (WHO) estimated that 296 million people were living with the virus worldwide, with 1.5 million new infections and more than 800,000 deaths each year. Hepatitis B is spread through sexual contact, blood exposure, mother-to-child transmission during childbirth, or sharing sharps. In some cases, the virus can persist for a lifetime. HBV belongs to the Hepadnaviridae family and has a protein nucleocapsid (core protein), involving a double-stranded DNA genetic material. The virus is enveloped in a lipoprotein envelope containing surface proteins (HBsAg), one of the first markers to appear in the blood after infection with the Hepatitis B virus. The immune response to HBV infection includes the development of antibodies specific to HBsAg, called anti-HBs. These antibodies appear a few weeks after HBsAg is detected in the blood, and are associated with recovery from infection. These antibodies also appear after the immunization process through hepatitis B vaccines. Therefore, the detection and monitoring of antibodies against HBsAg has become an important tool in the screening and follow-up of infected individuals, as well as an indicator of success of the vaccinated against HBV.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- 1- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR.
- 2- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 3- Frank Fenner and David O. White, Medical Virology, 4th Edition, Academic Press, 1994.
- 4- Richman, D., R. Whitley, F. Hayden. Clinical Virology. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997.
- 5- WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing. February 2017.
- 6- WHO. Guidelines for the Prevention, Care and Tretatment of Persons with Chronic Hepatites B Infection. March 2015.
- 7- WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-first report. 2013.
- 8- WHO. Hepatitis B Fact Sheets. Atualizado em 2021.
- 9- Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília, 2017.
- 10- Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais. Brasília, 2018.
- 11- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** reagents are tested by the Department of Quality Control. The quality of reagents is assured until expiration date stated on the presentation packaging, when stored and transported under appropriate conditions.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service
Phone: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Registration number of Biolisa Anti HBs kit at ANVISA: 10269360289

Review: August/2024

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR <N> TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER