Bioclin

BIOLISA HBsAg DBS

REF K252

INSTRUÇÕES DE USO

PARA OBTER AS INSTRUÇÕES DE USO EM FORMATO IMPRESSO, SEM CUSTO ADICIONAL, CONTATAR O SERVIÇO DE ASSESSORIA AO CLIENTE:

SAC: (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

FINALIDADE

Teste imunoenzimático para detecção qualitativa da presença do Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B em amostras de sangue seco coletadas em papel filtro (DBS). Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático

O kit BIOLISA HBsAg DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida com base no princípio "sanduíche" para a detecção qualitativa do HBsAg em amostras humanas de sangue total impregnado em papel de filtro. A microplaca é revestida com Anticorpos monoclonais específicos para os subtipos Ad e Ay do HBsAg. No primeiro momento, a amostra de sangue total impregnado em papel de filtro é incubada com o Tampão de Eluição. Se a amostra contiver HBsAg, este se ligará aos Anticorpos revestidos na microplaca. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados e, em seguida, Anticorpos Anti-HBs conjugados à Peroxidase são adicionados. A microplaca é novamente incubada e, na presença do HBsAg da amostra, formará imunocomplexos Anticorpo-HBsAg-Conjugado. Nova lavagem é realizada para remover os excedentes.

Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul que indica a presença de Antígeno de Hepatite B na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança de cor de azul para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

REAGENTES

1- Placa Sensibilizada - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Microplaca revestida com Anticorpos (monoclonal de camundongo) Anti-HBs (< 100 ng/poço).

2- Conjugado - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Anticorpos Anti-HBs ligados a Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.

3- Lavagem Concentrada - Conservar entre 2 e 8 ºC. Contém: Solução Tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.

4- Substrato - Conservar entre 2 e 8 ºC. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Ureia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.

5- Solução de Parada – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Clorídrico 1 M.

6- Seladores de Placa.

7- Tampão de Eluição - Conservar entre 2 e 8 ºC. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.

8- Contole Negativo DBS - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra não reativa para HBsAg, HCV, HIV-1 e HIV-2 impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

9- Controle Positivo DBS - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra reativa para HBsAg e negativa para HCV, HIV-1 e HIV-2 impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidade (96 cavidades)	2 Unidades (192 cavidades)	5 Unidades (480 cavidades)
2- Conjugado	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	1 Frascox 100 mL	1 Frasco x 250 mL
4- Substrato	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
5- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	1 Frascox 24 mL	1 Frasco x 60 mL
6- Seladores de Placa	3 Unidades	1 Unidade	1 Unidade
7- Tampão de Eluição	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
8 - Controle Negativo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades
9 - Controle Positivo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 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 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.

2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).

3- Lavadora de microplaca para técnica em papel filtro.

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 diluída.

8- Água destilada ou deionizada.

9- Ferramentas de Controle de Qualidade.

10- Incubadora de 37 °C ± 2 °C.

11- Picotador de papel (diâmetro de 3 mm).

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C. O transporte, em temperatura ambiente (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 estocar de 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 Clorídrico 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 e Anti-HIV 1&2. 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

Sangue Total em Papel de Filtro (Punção ou EDTA)

As amostras secas em papel de filtro podem ser armazenadas à temperatura ambiente desde que, fiquem protegidas de fonte de luz solar direta e baixa umidade. Para armazenamento de até 2 anos, as amostras devem permanecer sob refrigeração, entre 2 e 8 °C. O armazenamento por tempo superior a 2 anos, deve ser realizado a temperatura de -20 °C.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA HBsAg DBS é estável após aberto durante 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 frasco Nº 3 (Lavagem Concentrada) na proporção 1:20 de água destilada ou deionizada; por exemplo: 50 mL de solução de Lavagem Concentrada em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 ºC 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 o SAC (Serviço de Assessoria do Cliente).

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 ºC) por no mínimo 40 minutos.

1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS 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- Adicionar um disco de 3mm do Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e Amostras de Sangue Total em Papel de Filtro, previamente picotados, nas cavidades determinadas.

4- Pipetar 100 µL do Tampão de Eluição nas cavidades previamente determinadas para papel filtro, inclusive na cavidade para o Branco.

5- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos, cobrir as cavidades com selador de placas.

6- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.

7- Retirar o selador das cavidades.

8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora para técnica em papel filtro). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, previamente preparada, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem com agitação (shake) de 5 segundos. 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 Conjugado em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.

10- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

11- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.

12- Retirar o selador de placa das cavidades.

13- Repetir o item 8.

14- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades.

15- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

16- Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

17- Retirar o selador de placa das cavidades.

18- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.

19- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

20- 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 Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Branco	< 0,100
Controle Negativo DBS	< 0,100
Controle Positivo DBS	> 0,500

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

CÁLCULOS
QUALITATIVO

Calcular o Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:
Cut Off = Absorbância Média Obtida com o Controle Negativo DBS + 0,100

ITEM	ABSORBÂNCIA
Controle Negativo DBS	A1= 0,020
	A2= 0,021
Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo DBS+ 0,100	(0,020 + 0,021) / 2) + 0,100 = 0,121

Calcular o Índice dividindo a absorbância da Amostra pelo valor de Cut Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Amostra	2,145
Valor de Cut Off	0,121
Índice = Amostra / Valor de Cut Off	2,145 / 0,121 = 17,73

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usados para cálculo dos resultados.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Após o cálculo do índice das amostras, considerar os índices abaixo para determinação dos resultados.

RESULTADOS	QUALITATIVO PARA AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL EM PAPEL DE FILTRO
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	0,9 - 1,1

Observação: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecem indeterminados, 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 diagnóstico 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 descritivo da doença.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada para as concentrações de Triglicérides 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Um estudo de reatividade cruzada foi realizado, avaliando 106 amostras de sangue total em papel de filtro negativas para HBsAg , mas positivas para outras infecções. Dentre elas 5 amostras positivas para HIV, 9 amostras positivas para HTLV, 9 amostras positivas para Sífilis, 33 amostras positivas para HCV, 10 amostras positivas para Doença de Chagas, 10 amostras positivas para Zika, 10 amostras positivas para CMV, 10 amostras positivas para Rubéola e 10 amostras positivas para Toxoplasmose. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para HIV, HTLV, Sífilis, HCV, Doença de Chagas, Zika, CMV, Rubéola e Toxoplasmose. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnostico 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	1,312	3,897	0,115
Desvio Padrão	0,087	0,101	0,013
Coeficiente de Variação (%)	6,65	2,59	11,58

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	1,258	3,813	0,111
Desvio Padrão	0,089	0,119	0,010
Coeficiente de Variação (%)	7,11	3,13	9,42

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit BIOLISA HBsAg DBS foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzimaimunoensaio de referência. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA HBsAg DBS é de >99,9% e a especificidade clínica é de >99,9%.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA	Resultado Esperado	BIOLISA HBSAG DBS
Amostra Positiva	50	50
Amostra Negativa	50	50
Total de Amostras Testadas	100	100

Sensibilidade Clínica: >99,9% (50/50) - IC 95%: 92,9% - 100,0%
Especificidade Clínica: >99,9% (50/50) - IC 95%: 92,9% - 100,0%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A Hepatite B é uma doença infecciosa causada pelo vírus HBV que acomete o fígado. O vírus HBV é transmitido através do contato sexual, exposição pelo sangue (incluindo compartilhamento de objetos perfurocortantes) e transmissão de mãe para filho via placentária ou durante o parto. A infecção pelo HBV resulta em um número aparente de marcadores sorológicos e um dos primeiros desses marcadores é o Antígeno de Superfície de Hepatite B (HBsAg). Os principais subtipos de HBsAg inclui ad e ay, todos compartilhando o determinante comum 'a'. O HBsAg aparece entre 1 e 10 semanas após a infecção e antes das evidências bioquímicas da doença hepática ou icterícia. No entanto, para a maioria das pessoas, devido a sua alta produção, o HBsAg pode ser detectado após 30 dias da infecção. Este período é conhecido como janela diagnóstica. No estado de portador crônico, o HBsAg persiste por mais de 6 meses. Os anticorpos contra os antígenos do HBV aparecem entre 30 e 60 dias após a infecção, variando entre indivíduos. Este é o período conhecido como janela imunológica. A infecção pelo HBV pode provocar infecção aguda auto - limitante, hepatite fulminante, hepatite crônica com progressão para cirrose e insuficiência hepática, e estado de portador crônico assintomáticos. O vírus HBV em pessoas infectadas, persiste para o resto de suas vidas e pode ser transmitido para outras pessoas. Assim, a hepatite B se tornou um problema de saúde pública. Portanto, a triagem para HBsAg é recomendado para todos os doadores, mulheres grávidas e pessoas em grupos de alto risco.

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. ALLEN JUNIOR, L. V.; ANSEL, H. C. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10. ed. Baltimore: Wolters Kluwer, 2014. 809 p.
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. EP-25A: Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. Wayne: Clinical And Laboratory Standard Institute, 2009. 52 p.
5. DESHPANDE, S.S. Enzyme Imunoassays: from concept to development. New York: Chapman & Hall, 1996. 472 p.
6. TSITSILONIS, Ourania E.; THRASYVOULIDES, Apollon; BALAFAS, Apostolos; VOUTSAS, John F.; PAPAMICHAIL, Michael; LYMBERI, Peggy. Serological detection of hepatitis B viral infection by a panel of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 811-822, mar. 2004. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00563-6.
7. TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
8. 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 HBsAg DBS na ANVISA: 10269360349

Revisão: Setembro/2024

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

Bioclin

BIOLISA HBsAg DBS

REF **K252**

INSTRUCCIONES DE USO

PARA OBTENER LAS INSTRUCCIONES DE USO EN FORMATO IMPRESO, SIN COSTO ADICIONAL, CONTACTE CON EL SERVICIO DE ASESORAMIENTO AL CLIENTE:

SAC: +55 (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

FINALIDAD

Prueba inmunoenzimática para la detección cualitativa de la presencia del Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en muestras de sangre seca recolectadas en papel de filtro (DBS). Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Inmunoensayo enzimático o inmunoenzimatico
El kit BIOLISA HBsAg DBS es un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el principio "sándwich" para la detección cualitativa de HBsAg en muestras de sangre seca recolectadas en papel de filtro. La microplaca está recubierta con Anticuerpos monoclonales específicos para el Subtipos Ad y Ay de HBsAg. Al principio, la muestra de de sangre seca recolectadas en papel de filtro se incuba con el Tampón de Elución. Si la muestra contiene HBsAg, se unirá a los Anticuerpos recubiertos en la microplaca. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar se añaden los materiales no unidos y luego los Anticuerpos Anti-HBs conjugados con Peroxidasa. La microplaca se incuba de nuevo y, en el presencia de HBsAg en la muestra, formará inmunocomplejos Anticuerpo-HBsAg-Conjugado. Se realiza un nuevo lavado para eliminar el exceso.
Después de este paso, se agrega e incuba el Sustrato, produciendo un color azul que indica la presencia del Antígeno de la Hepatitis B en la muestra. Los se agrega Solución de Parada para detener la reacción, hay un cambio de color de azul a amarillo medido en un microplacas.

REACTIVOS

1- Placa Sensibilizada - Conservar entre 2 y 8 ºC. Contiene: Microplaca recubierta con Anticuerpos (monoclonales de ratón) Anti-HBs (< 100 ng/pozo).
2- Conjugado - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Anticuerpos Anti-HBs ligados a Peroxidasa, surfactante, estabilizantes, colorante y conservante.
3- Lavado Concentrado - Conservar entre 2 y 8 ºC. Contiene: Solución Tampón (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloruro de Potasio < 100 mmol/L, Cloruro de Sodio < 5 mol/L), tensioactivo y conservante
4- Sustrato - Conservar entre 2 y 8 ºC. Contiene: Solución Tampón que contiene Peróxido de Urea, Tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
5- Solución de Parada - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución de Ácido Clorhídrico 1 M.
6- Selladores de placas.
7- Tampón de Elución - Almacenar entre 2 y 8 ºC. Contiene: Solución Tampón, tensioactivo, estabilizador y conservante.
8- Control Negativo DBS - Almacenar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Muestra no reactiva para HBsAg, HCV, HIV-1 y HIV-2 impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso**.
9- Control Positivo DBS - Almacenar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Muestra reactiva para HBsAg y negativa para HCV, HIV-1 y HIV-2 impregnado en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso**.

PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidad (96 cavidades)	2 Unidades (192 cavidades)	5 Unidades (480 cavidades)
2- Conjugado	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Lavado Concentrado	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
4- Sustrato	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
5- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6- Selladores de Placa	3 Unidades	1 Unidad	1 Unidad
7- Tampón de Elución	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
8 - Control Negativo DBS	1 Unidad	2 Unidades	3 Unidades
9 - Control Positivo DBS	1 Unidad	2 Unidades	3 Unidades

EQUIPOS Y INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:
- Reactivos descritos en el ítem anterior.

Materiales necesarios no contenidos en el kit:
1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 5 a 300 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 para la técnica del papel de filtro.
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.
11- Trituradora de papel (3 mm de diámetro).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPUERTE

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

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso de 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 ºC.
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 Clorhídrico, 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 y Anti-HIV 1 & 2. 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 Dados de Seguridad) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o a solicitud del Cliente SAC (Servicio de Atención 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

Sangre Total en Papel de Filtro (Punción o EDTA)
Las muestras secadas en papel de filtro se pueden almacenar a temperatura ambiente siempre que estén protegidas de la luz solar directa y la baja humedad. Para un almacenamiento de hasta 2 años, las muestras deben conservarse refrigeradas entre 2 y 8 ºC. El almacenamiento durante más de 2 años debe realizarse a una temperatura de -20 ºC.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto
Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit BIOLISA HBsAg DBS es estable después de haber sido abierto durante 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.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE TRABAJO

Solucion de Lavado
Diluir el contenido de la ampolla Nº 3 (Lavado Concentrado) en proporción 1:20 de agua destilada o desionizada; por ejemplo: 50 mL de Solución de Lavado Concentrado en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Después de la preparación, la solución puede almacenarse entre 2 y 30 °C durante un máximo de 30 días. Si ocurre cristalización, calentar a 37 °C hasta disolución.

Substrato
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 estabilicen a temperatura ambiente (15-30 ºC) durante al menos 40 minutos.
1- Separe las cavidades a utilizar considerando: Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y Muestras (se recomienda probar por duplicado). Regrese las tiras de microplacas sin usar al empaque original sellado.
2- Separe la primera cavidad para Blanco (OPCIONAL).
3- Agregue un disco de 3 mm de Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y Muestras de Sangre Total en Papel de Filtro, previamente perforado, en las cavidades determinadas.
4- Pipetee 100 µL del Tampón de Elución o en los pocillos previamente determinados para el papel de filtro, incluido el Blanco.
5- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir los pocillos con sellador de placas.
6- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.
7- Retirar el sellador de las cavidades.
8- Desechar el contenido de las cavidades por aspiración (Lavador para técnica de papel de filtro). Utilice aproximadamente 300 µL de solución de lavado, previamente preparada, y haga un total de cinco (5) ciclos de lavado con agitación (*agitar*) de 5 segundos. Para garantizar 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 resultados inapropiados.
9- Pipetee 100 µL de Conjugado en todos los pocillos, incluido el pocillo del blanco.
10- Mezclar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
11- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.
12- Retire el sellador de placas de los pocillos.
13- Repita el ítem 8.
14- Pipetee 100 µL de Sustrato en todos los pocillos.
15- Mezclar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
16- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 ° C ± 2 ° C.
17- Retire el sellador de placas de los pocillos.
18- Pipetee 100 µL de Solución de Parada en todos los pocillos.
19- Mezclar suavemente durante ± 30 segundos.
20- Leer con doble filtro: 450 nm / 630 nm en 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TECNICA

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

ITEM	ABSORBANCIAS
Blanco	< 0,100
Control Negativo DBS	< 0,100
Control Positivo DBS	> 0,500

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

CÁLCULOS
CUALITATIVO

Calcule el Cut Off de acuerdo con la siguiente fórmula:
Cut Off = Absorbancia de Control Negativo Promedio DBS + 0,100

ITEM	ABSORBANCIA
Control Negativo DBS	A1= 0,020
	A2= 0,021
Cut Off = Absorbancia de Control Negativo Promedio DBS+ 0,100	(0,020 + 0,021) / 2) + 0,100 = 0,121

Calcule el índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	2,145
Valor de Cut Off	0,121
Índice = Muestra / Valor de Cut Off	2,145 / 0,121 = 17,73

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son solo ilustrativos y no se pueden utilizar para calcular los resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Después de calcular el índice de la muestra, considere los índices siguientes para determinar los resultados.

RESULTADOS	CUALITATIVO PARA MUESTRAS DE SANGRE TOTAL EN PAPEL DE FILTRO
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	Entre 0,9 - 1,1

Nota: En el caso de un resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse. Las muestras que obtienen resultados indeterminados repetidamente deben volver a analizarse utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra en dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recolectada, los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, y no es 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 las concentraciones de Triglicéridos 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albúmina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Factor Reumatoide 980 UI / mL, Proteína C Reactivo 41,2 mg/dL y Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio de reactividad cruzada, evaluando 106 muestras de sangre entera HBsAg negativas pero positivas en papel de filtro para otras infecciones. Entre ellos, 5 muestras positivas para HIV, 9 muestras positivas para HTLV, 9 muestras positivas para sífilis, 33 muestras positivo para HCV, 10 muestras positivas para la enfermedad de Chagas, 10 muestras positivas para Zika, 10 muestras positivas para CMV, 10 muestras positivo para Rubéola y 10 muestras positivas para Toxoplasmosis. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para HIV, HTLV, Sífilis, HCV, Enfermedad de Chagas, Zika, CMV, Rubéola y Toxoplasmosis. A pesar de los resultados encontrados, la posibilidad de reactividad cruzada. 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	1,312	3,897	0,115
Desvio Patrón	0,087	0,101	0,013
Coeficiente de Variación (%)	6,65	2,59	11,58

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	1,258	3,813	0,111
Desvio Patrón	0,089	0,119	0,010
Coeficiente de Variación (%)	7,11	3,13	9,42

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

El kit BIOLISA HBsAg DBS se utilizó para el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas por otro método de inmunoensayo enzimático de referencia. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA HBsAg DBS es >99,9% y la especificidad clínica es >99,9%.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA	Resultado Esperado	BIOLISA HBSAG DBS
Muestra Positiva	50	50
Muestra Negativa	50	50
Total de Muestra Testadas	100	100

Sensibilidad Clínica: >99,9% (50/50) - IC 95%: 92,9% - 100,0%
Especificidad Clínica: >99,9% (50/50) - IC 95%: 92,9% - 100,0%

SIGNIFICADO CLÍNICO

La hepatitis B es una enfermedad infecciosa causada por el virus del VHB que afecta al hígado. El virus del VHB se transmite a través del contacto sexual, la exposición a la sangre (incluido el compartir objetos punzantes) y la transmisión de madre a hijo a través de la placenta o durante el parto. La infección por VHB da como resultado un número aparente de marcadores serológicos y uno de los primeros de estos marcadores es el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Los principales subtipos de HBsAg incluyen ad y ay, todos comparten el determinante común “a”. El HBsAg aparece entre 1 y 10 semanas después de la infección y antes de la evidencia bioquímica de enfermedad hepática o ictericia. Sin embargo, para la mayoría de las personas, debido a su alta producción, el HBsAg se puede detectar dentro de los 30 días posteriores a la infección. Este período se conoce como ventana de diagnóstico. En el estado de portador crónico, el HBsAg persiste durante más de 6 meses. Los anticuerpos contra los antígenos del VHB aparecen entre 30 y 60 días después de la infección, y varían de un individuo a otro. Este es el período conocido como ventana inmune. La infección por VHB puede causar infección aguda autolimitada, hepatitis fulminante, hepatitis crónica con progresión a cirrosis e insuficiencia hepática y estado de portador crónico asintomático. El virus del VHB en personas infectadas persiste por el resto de sus vidas y puede transmitirse a otras personas. Por tanto, la hepatitis B se ha convertido en un problema de salud pública. Por lo tanto, se recomienda el cribado de HBsAg para todos los donantes, mujeres embarazadas y personas en grupos de alto riesgo.

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. ALLEN JUNIOR, L. V.; ANSEL, H. C. Ansel’s Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10. ed. Baltimore: Wolters Kluwer, 2014. 809 p.
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. EP-25A: Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. Wayne: Clinical And Laboratory Standard Institute, 2009. 52 p.
5. DESHPANDE, S.S. Enzyme Imunoassays: from concept to development. New York: Chapman & Hall, 1996. 472 p.
6. TSITSILONIS, Ourania E.; THRASYVOULIDES, Apollon; BALAFAS, Apostolos; VOUTSAS, John F.; PAPAMICHAIL, Michael; LYMBERI, Peggy. Serological detection of hepatitis B viral infection by a panel of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 811-822, mar. 2004. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00563-6.
7. TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
8. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de su liberación para el consumo, todos los reactivos de Bioclin son analizados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está asegurada hasta la fecha de caducidad mencionada en el empaque de presentación, siempre y cuando 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 Brasileña

ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR
Servicio de Atención al Cliente
Tel.: 0800 0315454 |E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro del kit BIOLISA HBsAg DBS en ANVISA: 10269360349

Revisión: Septiembre/2024

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

Bioclin

BIOLISA HBsAg DBS

REF K252

INSTRUCTIONS FOR USE

TO OBTAIN THE INSTRUCTIONS FOR USE IN PRINTED FORMAT, AT NO ADDITIONAL COST, CONTACT CUSTOMER ADVISORY SERVICE:

SAC: +55 (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

FUNCTION

Immunoenzymatic test for qualitative detection of the presence of Hepatitis B virus surface Antigen in dried blood spot collected on filter paper (DBS). Only for *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic

The BIOLISA HBsAg DBS kit is a solid-phase enzyme immunoassay based on the "sandwich" principle for the qualitative detection of HBsAg in human samples of dried blood spot collected on filter paper. The microplate is coated with monoclonal Antibodies specific for the Ad and Ay subtypes of HBsAg. At first, the dried blood spot impregnated on filter paper is incubated with the Elution Buffer. If the sample contains HBsAg, it will bind to the Antibodies coated on the microplate. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials and then Peroxidase-conjugated Anti-HBs Antibodies are added. The microplate is again incubated and, in the presence of HBsAg in the sample, it will form immunocomplexes Antibody-HBsAg-Conjugate. A new wash is carried out to remove the excess.

After this step, the Substrate is added and incubated, producing a blue color that indicates the presence of Hepatitis B Antigen in the sample. The Stop Solution is added to stop the reaction, there is a color change from blue to yellow as measured on a microplates.

REAGENTS

1- Sensitized Plate - Store at 2 to 8°C. Contains: Microplate coated with Antibodies (mouse monoclonal) Anti-HBs (< 100 ng/well).

2- Conjugate - Store between 2 and 8°C. Contains: Anti-HBs Antibodies linked to Peroxidase, surfactant, stabilizers, colorant and preservative.

3- Concentrated Washing - Store between 2 and 8 ºC. Contains: Buffer Solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.

4- Substrate - Store between 2 and 8 ºC. Contains: Buffer Solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.

5- Stop Solution – Store between 2 and 8°C. Contains: 1 M Hydrochloric Acid Solution.

6 - Plate Sealers.

7 - Elution Buffer - Store between 2 and 8 ºC. Contains: Buffer Solution, surfactant, stabilizer and preservative.

8 - DBS Negative Control - Store at 2 to 8 °C. Contains: Non-reactive sample for HBsAg, HCV, HIV-1 and HIV-2 impregnated in filter paper. **Potentially infectious.**

9 - DBS Positive Control - Store at 2 to 8 °C. Contains: Sample reactive for HBsAg and negative for HCV, HIV-1 and HIV-2 impregnated in filter paper. **Potentially infectious.**

PRESENTATION

REAGENT	1	2	3
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities
1- Sensitized Plate	1 Unit (96 Cavities)	2 Units (192 Cavities)	5 Units (480 Cavities)
2 - Conjugate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3 - Concentrated Washing	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
4 - Substrate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
5 - Stop Solution	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6 - Plate Sealers	3 Units	1 Unit	1 Unit
7- Elution Buffer	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
8- DBS Negative Control	1 Unit	2 Units	3 Units
9- DBS Positive Control	1 Unit	2 Units	3 Units

EQUIPAMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:

- Reagents described in the previous item.

Necessary materials not contained in the kit:

1- Pipettes capable of dispensing volumes of 5 to 300 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 for filter paper technique.
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.
11- Paper shredder (3 mm diameter).

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

Storage temperature should be between 2 and 8 ºC. 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 ºC.
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 Hydrochloric 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 and Anti-HIV 1 & 2. 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 Service Department) 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

Dried Blood collected on filter paper (DBS) - EDTA or Puncture

Samples dried on filter paper can be stored at room temperature as long as they are protected from direct sunlight and low humidity. For storage of up to 2 years, samples must be kept refrigerated at between 2 and 8 ºC. Storage for more than 2 years must be carried out at a temperature of -20 ºC.

PROCESSS DESCRIPTION

Stability After Open

The results of the stability test show that the BIOLISA HBsAg DBS kit is stable after being opened for 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 WORK REAGENTS

Washing Solution

Dilute the contents of vial Nº 3 (Concentrated Washing) in a 1:20 ratio of distilled or deionized water; for example: 50 mL of Concentrated Washing solution in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored between 2 and 30°C for up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolution.

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 ºC) for at least 40 minutes.

1- Separate the cavities to be used considering: DBS Positive Control, DBS Negative Control and Samples (it is recommended to test in duplicate). Return unused microplate strips to the original sealed packaging.
2- Separate the first cavity for the Blank (OPTIONAL).
3- Add a 3mm disk of DBS Positive Control, DBS Negative Control and Dried Blood Spot collected on filter paper, previously perforated, in the determined cavities.
4- Pipette 100 µL of the Elution Buffer into the wells previously determined for filter paper, including the well for the White.
5- Homogenize gently for ± 30 seconds, cover the wells with plate sealer.
6- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 ºC ± 2 ºC.
7- Remove the sealant from the cavities.
8- Discard the contents of the cavities by aspiration (Washer for filter paper technique). Use approximately 300 µL of Wash Solution, previously prepared, and make a total of five (5) wash cycles with shaking (*shake*) of 5 seconds. To guarantee the drying of the plate, at the end of the washing, tap the plate for a few seconds on absorbent paper. Note: Poor washing/drying may cause inappropriate results.
9- Pipette 100 µL of Conjugate into all wells, including the Blank well.
10- Mix gently for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
11- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 ºC ± 2 ºC.
12- Remove the plate sealer from the wells.
13- Repeat item 8.
14- Pipette 100 µL of Substrate into all wells.
15- Mix gently for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
16- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
17- Remove the plate sealer from the wells.
18- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
19- Mix gently for ± 30 seconds.
20- Read using a double filter: 450 nm / 630 nm within 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

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

ITEM	ABSORBANCES
Blank	< 0.100
DBS Negative Control	< 0.100
DBS Positive Control	> 0.500

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

CALCULATIONS

QUALITATIVE

Calculate Cut Off according to the following formula:
Cut Off = Average DBS Negative Control Absorbance + 0.100
Example:

ITEM	ABSORBANCE
DBS Negative Control	A1= 0.020
	A2= 0.021
Cut Off = Average DBS Negative Control Absorbance + 0.100	(0.020 + 0.021) / 2) + 0.100 = 0.121

Calculate the Index by dividing the Sample's absorbance by the Cut Off value.
Example:

ITEM	ABSORBANCE
Sample	2.145
Cut Off Value	0.121
Índice = Samples / Cut Off Value	2.145 / 0.121 = 17.73

Note: The data presented in the examples are for illustration only and cannot be used to calculate the results.

INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the sample index, consider the indices below to determine the results.

RESULTS	QUALITATIVE FOR WHOLE BLOOD ON FILTER PAPER SAMPLES
	INDEX
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Undeterminated	Between 0.9 - 1.1

Note: In the case of an undetermined result, the sample must be re-analyzed. Samples that obtain repeatedly indeterminate results should be retested using an alternative method. If the results remain indeterminate, a new sample should be collected in two weeks. The result of the last collected sample must prevail. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, and it is not the only criterion for determining the diagnosis and / or treatment of the patient.

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 the concentrations of Triglycerides 1200 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 10 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Rheumatoid Factor 980 IU/mL, Protein C Reactive 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 IU/mL.

CROSS REACTIVITY

A cross-reactivity study was performed, evaluating 106 HBsAg-negative but positive whole blood samples on filter paper for other infections. Among them 5 HIV positive samples, 9 HTLV positive samples, 9 Syphilis positive samples, 33 samples positive for HCV, 10 samples positive for Chagas Disease, 10 samples positive for Zika, 10 samples positive for CMV, 10 samples positive for Rubella and 10 positive samples for Toxoplasmosis. No cross-reactivity was observed with positive samples for HIV, HTLV, Syphilis, HCV, Chagas Disease, Zika, CMV, Rubella and Toxoplasmosis. Despite the results found, the possibility of cross-eactivity. The final diagnosis must 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
Averange	1.312	3.897	0.115
Standard Deviation	0.087	0.101	0.013
Coefficient of Variation (%)	6.65	2.59	11.58

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
Averange	1.258	3.813	0.111
Standard Deviation	0.089	0.119	0.010
Coefficient of Variation (%)	7.11	3.13	9.42

CLINICAL SENSITIVUTY AND SPECIFICITY

The BIOLISA HBsAg DBS kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed by another reference enzyme immunoassay method. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA HBsAg DBS kit is >99.9% and the clinical specificity is >99.9%.

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY	Resultado Esperado	BIOLISA HBSAG DBS
Positive Sample	50	50
Negative Sample	50	50
Total Tested Samples	100	100

Clinical Sensitivity: >99.9% (50/50) - IC 95%: 92.9% - 100,0%
Clinical Specificity: >99.9% (50/50) - IC 95%: 92.9% - 100,0%

CLINICAL SIGNIFICANCE

Hepatitis B is an infectious disease caused by the HBV virus that affects the liver. The HBV virus is transmitted through sexual contact, blood exposure (including sharing sharps) and mother-to-child transmission via the placenta or during childbirth. HBV infection results in an apparent number of serological markers and one of the first of these markers is the Surface Antigen of Hepatitis B (HBsAg). The main HBsAg subtypes include ad and ay, all sharing the common determinant 'a'. HBsAg appears between 1 and 10 weeks after infection and before biochemical evidence of liver disease or jaundice. However, for most people, due to its high production, HBsAg can be detected after 30 days of infection. This period is known as the diagnostic window. In the bearer state chronic, HBsAg persists for more than 6 months. Antibodies against HBV antigens appear between 30 and 60 days after infection, varying between individuals. This is the period known as the immune window. HBV infection can cause self-limiting acute infection, hepatitis fulminant, chronic hepatitis with progression to cirrhosis and liver failure, and asymptomatic chronic carrier status. The HBV virus in infected people, persists for the rest of their lives and can be transmitted to other people. Thus, hepatitis B has become a problem of public health. Therefore, screening for HBsAg is recommended for all donors, pregnant women and people in high-risk groups.

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. ALLEN JUNIOR, L. V.; ANSEL, H. C. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10. ed. Baltimore: Wolters Kluwer, 2014. 809 p.
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. EP-25A: Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. Wayne: Clinical And Laboratory Standard Institute, 2009. 52 p.
5. DESHPANDE, S.S. Enzyme Imunoassays: from concept to development. New York: Chapman & Hall, 1996. 472 p.
6. TSITSILONIS, Ourania E.; THRASYVOULIDES, Apollon; BALAFAS, Apostolos; VOUTSAS, John F.; PAPAMICHAIL, Michael; LYMBERI, Peggy. Serological detection of hepatitis B viral infection by a panel of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 811-822, mar. 2004. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00563-6.
7. TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
8. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

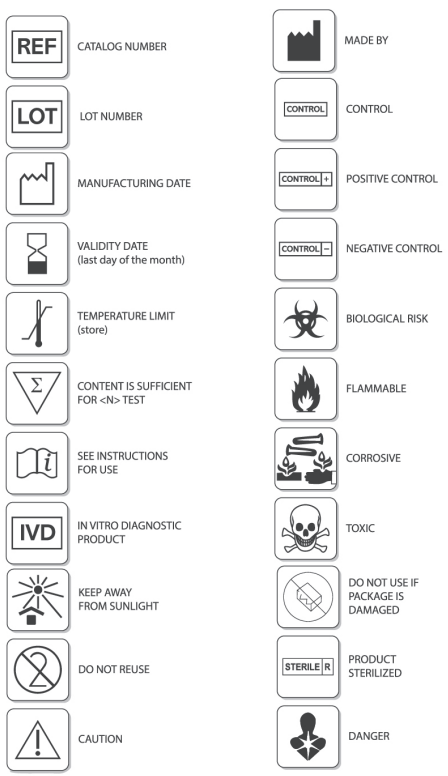
Before being released for consumption, all Bioclin reagents are tested by the Quality Control Department. The quality of the reagents is ensured until the expiration date mentioned on the presentation packaging, as long as they are stored and transported under the appropriate conditions.

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

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

Registration number of the BIOLISA HBsAg DBS kit at ANVISA: 10269360349

Review: September/2024

UNIVERSAL SYMBOLOGY