

BIOLISA HBsAg WBS

K252

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

FINALIDADE

Teste para detecção qualitativa da presença do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B em amostras biológicas (sangue total impregnado em papel de filtro), através de teste enzimaimunoensaio. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático

O kit BIOLISA HBsAg WBS 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°C. 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°C. 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- Controle Negativo – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução não reativa para HBsAg, HCV, HIV-1 e HIV-2, estabilizante e conservante. **Potencialmente infectante.**

7- Controle Positivo – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução contendo HBsAg e negativa para HCV, HIV-1 e HIV-2, estabilizante, corante e conservante. **Potencialmente infectante.**

8- Seladores de Placa.

9- Tampão de Eluição em Papel de Filtro - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, surfactante, estabilizante e conservante.

10- Contole Negativo de Extração - 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.**

11- Controle Positivo de Extração - 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	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	2 Frascos x 50 mL	5 Frascos x 50 mL
4- Substrato	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
5- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
6- Controle Negativo	1 Frasco x 1 mL	2 Frascos x 1 mL	5 Frascos x 1 mL
7- Controle Positivo	1 Frasco x 1 mL	2 Frascos x 1 mL	5 Frascos x 1 mL
8- Seladores de Placa	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades
9- Tampão de Eluição em Papel Filtro	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
10 - Controle Negativo de Extração	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
11 - Controle Positivo de Extração	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior

- Instruções de Uso (manual)

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 absorvância 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 FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) 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 WBS é estável após aberto durante, pelo menos, 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° 3 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água destilada ou deionizada.

Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 °C durante, pelo menos, 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 °C) por no mínimo 40 minutos. Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.

1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controle Positivo, Controle Negativo, Controle Positivo de Extração, Controle Negativo de Extração 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 100 µL dos Controles Positivo e Negativo nas cavidades previamente determinadas.

4- Adicionar um disco de 3mm do Controle Positivo de Extração, Controle Negativo de Extração e Amostras de Sangue Total em Papel de Filtro, previamente picotados, nas cavidades determinadas.

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

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

7- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

8- Retirar o selador das cavidades.

9- 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.

10- Pipetar 100 µL de Conjugado em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.

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

12- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.

13- Retirar o selador de placa das cavidades.

14- Repetir o item 9.

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

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

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

18- Retirar o selador de placa das cavidades.

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

20- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

21- 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	ABSORVÂNCIA
Branco	< 0,100
Controle Negativo (R6)	< 0,100
Controle Positivo (R7)	> 1,000
Controle Negativo de Extração (R10)	< 0,100
Controle Positivo de Extração (R11)	> 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 (R6) + 0,100.

ITEM	ABSORBÂNCIA
Controle Negativo (R6)	A1= 0,020
	A2= 0,021
Cut Off = Absorbância Média Obtida com o Controle Negativo + 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	$2,145 / 0,121 = 17,7$

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 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	1,312	3,897	0,115
Desvio Padrão	0,087	0,101	0,013
Coefficiente 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
Coefficiente de Variação (%)	7,11	3,13	9,42

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

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

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA	Resultado Esperado	BIOLISA HBSAG WBS
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 serum 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 Immunoassays: from concept to development. New York: Chapman & Hall, 1996. 472 p.
6. TSITSILONIS, Ourania E.; THRASYVOULIDES, Apollon; BALAFAS, Apostolos; VOITSAS, John F.; PAPANICHAEL, 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](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 WBS na ANVISA: 10269360349

Revisão: Maio/2022

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 at)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA (n) TESTE		INFLAMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZAR		PRODUTO ESTERILIZADO
	CUIDADO		PERIGO