

BIOLISA HCV DBS

[REF] K245

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de Anticorpos Totais contra o Vírus da Hepatite C (HCV) em amostras de **sangue seco coletadas em papel filtro (DBS)**. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático.
O BIOLISA HCV DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio “sanduíche”, para a detecção qualitativa de Anticorpos contra o Vírus da Hepatite C (HCV) em amostras humanas de sangue seco coletadas em papel filtro. A microplaca é revestida com Antígenos Recombinantes de HCV (Core, NS3, NS4 e NS5). No primeiro momento, a amostra de sangue seco é eluída pelo Tampão de Eluição e incubada junto ao Conjugado 1, constituído de Antígenos Recombinantes de HCV conjugados à Biotina. Anticorpos Anti-HCV presentes na amostra se ligam aos Antígenos de HCV imobilizados na microplaca e aos Antígenos biotinilados presentes no Conjugado 1, formando o imunocomplexo Antígeno-Anticorpo-Antígeno biotinilado. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O Conjugado 2, constituído de Estreptavidina conjugada à Peroxidase, é adicionado à microplaca, que é então incubada. A Estreptavidina se liga aos Antígenos biotinilados, por sua vez ligados aos Anticorpos Anti-HCV. Uma nova lavagem é realizada para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul que indica a detecção de Anticorpos Anti-HCV presentes 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 microplaca.

REAGENTES

- 1- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Placa sensibilizada com Antígenos Recombinantes de HCV.
- 2- Conjugado 1** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão contendo Antígenos Recombinantes de HCV ligados à Biotina, 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- Conjugado 2** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão contendo Estreptavidina ligada à Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante 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. Contém: Ácido Clorídrico 1 M.
- 7- Tampão de Eluição em Papel de Filtro** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.
- 8- Controle Negativo DBS** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra não reativa para Anticorpos Totais Anti-HCV impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**
- 9- Controle Positivo DBS** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra reativa para Anticorpos Totais Anti-HCV impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3	4
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades	960 Cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades	10 Unidades
2- Conjugado 1	1 Frasco x 6 mL	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 30 mL	1 Frasco x 60 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	1 Frasco x 100 mL	1 Frasco x 250 mL	1 Frasco x 500 mL
4- Conjugado 2	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL	1 Frasco x 120 mL
5- Substrato	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL	1 Frasco x 120 mL
6- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL	1 Frasco x 120 mL
7-Tampão de Eluição em Papel Filtro	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL	1 Frasco x 120 mL
8- Controle Negativo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades	5 Unidades
9- Controle Positivo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades	5 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.

Materiais necessários não contidos no kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 50 a 500 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 620 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 37 °C ± 2 °C.
- 11- Picotador de papel (diâmetro de 3 ± 0,2 mm).

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 Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.

- 7- Toda matéria-prima do produto é testada sendo não reagente para HBsAg e Anti-HIV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém amostra biológica 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 Seco coletado em papel filtro (DBS) - EDTA ou Punção

O papel filtro utilizado deve ser específico para coleta de amostras de sangue seco, a exemplo dos modelos S&S 903 e Ahlstrom 226. O laboratório deve certificar da qualidade das amostras antes da sua utilização. As amostras de sangue seco em papel filtro podem ser armazenadas por até 35 dias à temperatura ambiente, desde que fiquem protegidas de fonte de luz solar direta e em 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 à temperatura de -20 °C.⁷

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA HCV DBS 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 frasco N° 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 °C por até 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

Todos os demais reagentes são prontos para uso.

TÉCNICA

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

- 1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel de filtro (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 3 mm de Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel filtro, previamente picotados, nas cavidades determinadas.

- 4- Pipetar 50 µL do Tampão de Eluição, em todas as cavidades, **inclusive na cavidade do Branco**.
- 5- Pipetar 50 µL do Conjugado 1, **inclusive na cavidade do Branco**.
- 6- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placas.
- 7- Incubar por 60 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 8- Após incubação descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora própria para técnica de papel filtro). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada**, e efetuar um total de cinco (5) 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 Conjugado 2 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 °C ± 2 °C.
- 12- Retirar o selador de placa das cavidades.
- 13- Repetir o item 8.
- 14- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades, **inclusive na cavidade do Branco**.
- 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 / 620 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	ABSORBÂNCIAS
Branco	< 0,120
Controle Negativo DBS	< 0,120
Controle Positivo DBS	> 0,500

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

CÁLCULOS

QUALITATIVOS

Calcular Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo DBS + 0,070.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Controle Negativo DBS	0,054
	0,057
Cut Off = (Absorbância Média do Controle Negativo DBS) + 0,070	((0,054 + 0,057) / 2) + 0,070 = 0,126

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

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Amostra	1,023
Valor de Cut Off	0,126
Índice = Amostra / Valor de Cut Off	1,023 / 0,126 = 8,12

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados. Cada laboratório deverá validar o cut-off conforme instrumentação utilizada e população pesquisada.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

RESULTADOS	QUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo (Não Reagente)	≤ 0,8
Indeterminado	0,8 e 1,2
Positivo (Reagente)	≥ 1,2

Observações: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada em duplicata. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. 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. 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. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo. 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.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada por Triglicérides até 1500 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico até 20 mg/dL, Ácido Ascórbico até 2 g/dL, Creatina até 200 mg/dL, Bilirrubina até 1 g/dL, Albumina até 10 g/dL, Hemoglobina até 1000 mg/dL, Ácido Oxálico até 60 mg/dL, Fator Reumatoide até 980 UI/mL, Proteína C Reativa até 41,2 mg/dL e Anti Estreptolisina O até 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Um estudo de reatividade cruzada foi realizado, avaliando 88 amostras negativas para HCV, mas positivas para outras infecções. Dentre elas 5 amostras positivas para HIV, 9 amostras positivas para HTLV, 9 amostras positivas para Sífilis, 9 amostras positivas para HBsAg, 10 amostras positivas para Doença de Chagas, 6 amostras positivas para Zika, 10 amostras positivas para CMV, 10 amostras positivas para Rubéola, 10 amostras positivas para Toxoplasmose e 10 amostras positivas para SARS-CoV-2. Não foi observada reatividade cruzada com amostras positivas para HIV, HTLV, Sífilis, HBsAg, Doença de Chagas, Zika, CMV, Rubéola, Toxoplasmose e SARS-CoV-2. 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	2,159	1,709	0,038
Desvio Padrão	0,049	0,067	0,007
Coefficiente de Variação (%)	2,26	3,94	18,51

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 absorbancia:

Reprodutibilidade	Amostra		
	1	2	3
Média	2,340	1,899	0,042
Desvio Padrão	0,135	0,081	0,006
Coefficiente de Variação (%)	5,68	4,33	14,86

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit BIOLISA HCV DBS foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzimaímunoensaio de referência. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA HCV DBS é >99,9% e a especificidade clínica é 99,43%.

		Resultado Referência		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA HCV DBS	Positivo	83	1	84
	Negativo	0	175	175
	Total	83	176	259

Sensibilidade Clínica: >99,9% (83/83) - IC 95% = 95,7 a 100%.
Especificidade Clínica: 99,4% (175/176) - IC 95% = 96,9 a 100%.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A Hepatite C, anteriormente chamada de Hepatite não-A e não-B, é uma doença causada pela transmissão parenteral do Vírus da Hepatite C (HCV). O HCV é um vírus envelopado constituído com apenas uma molécula de RNA no seu genoma, que codifica 3 proteínas estruturais (uma proteína do capsídeo, ou core, e duas proteínas de envelope, E1 e E2) e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). As principais vias de transmissão do vírus são através de transfusão de sangue e hemoderivados, transplante de órgãos e compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas. A maioria dos casos de infecção por HCV é assintomática e cerca de 15 a 20% possuem sintomas inespecíficos como fadiga, perda de apetite, perda de peso, febre e dor abdominal. Cerca de 50 a 80% dos casos de infecção por HCV se cronificam e podem evoluir para fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular. O diagnóstico sorológico da Hepatite C é o primeiro passo para a identificação dos indivíduos infectados, sendo o diagnóstico precoce o principal meio de reduzir a morbimortalidade causada pelo HCV.

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- Warkad, S. D. et al. Developments in the HCV Screening Technologies Based on the Detection of Antigens and Antibodies. Sensors. 2019;19:4257.
- 4- Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelas Hepatites Virais. 2018.
- 5- Van der Poel, C. L., H.T.M. Cuypers, H.W. Reesink, and P.N.Lelie. Confirmation of Hepatitis C Virus Infection by New Four-antigen Recombinant Immunoblot Assay. Lancet. 1991;337:317.
- 6- Wilber, J.C. Development and Use of Laboratory Tests for Hepatitis C Infection: A Review. J. Clinical Immunoassay. 1993;16:204.
- 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 HCV DBS na ANVISA: 10269360435

Revisão: Julho/2023

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 ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO

BIOLISA HCV DBS

[REF] **K245**

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cualitativa de Anticuerpos Totales contra el Virus de la Hepatitis C (HCV) en muestras de **sangre seca recogidas en papel filtro (DBS)**. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Inmunoensayo enzimático o inmunoensayo enzimático. BIOLISA HCV DBS es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, basado en el principio de "sandwich", para la detección cualitativa de Anticuerpos contra el Virus de la Hepatitis C (HCV) en muestras de sangre humana seca recolectadas en papel de filtro. La microplaca está recubierta con Antígenos Recombinantes del HCV (Core, NS3, NS4 y NS5). En primer lugar, la muestra de sangre seca se eluye con el Tampón de Elución y se incuba con el Conjugado 1, que consta de Antígenos Recombinantes del HCV conjugados con Biotina. Los Anticuerpos Anti-HCV presentes en la muestra se unen a los Antígenos del HCV inmovilizados en la microplaca y los Antígenos biotinilados presentes en el Conjugado 1, formando el inmunocomplejo Antígeno-Anticuerpo-Antígeno biotinilado. Después de la incubación inicial, lava la microplaca para eliminar los materiales no unidos. El Conjugado 2, que consta de Estreptavidina conjugada con Peroxidasa, se agrega a la microplaca, que luego se incuba. La Estreptavidina se une a los Antígenos biotinilados, que a su vez se unen a los Anticuerpos Anti-HCV. Se realiza un nuevo lavado para eliminar los excesos. Luego de este paso, se agrega el Sustrato y se incuba, produciendo un color azul que indica la detección de Anticuerpos Anti-HCV presentes 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- Placa Sensibilizada - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Placa sensibilizada con Antígenos Recombinantes del HCV.
2- Conjugado 1 - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón que contiene Antígenos Recombinantes del HCV unidos a Biotina, tensioactivo, estabilizantes, colorante y conservante.
3- 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.
4- Conjugado 2 - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón que contiene Estreptavidina unida a Peroxidasa, tensioactivo, estabilizantes, colorante y conservante.
5- Sustrato - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón que contiene Peróxido de Urea, Tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
6- Solución de Parada - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Ácido Clorhídrico 1 M.
7- Tampón de Elución en Papel Filtro - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón, tensioactivo, estabilizante y conservante.
8- Control Negativo DBS - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Muestra no reactiva para Anticuerpos Totales Anti-HCV impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**
9- Control Positivo DBS - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Muestra reactiva para Anticuerpos Totales Anti-HCV impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**

PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3	4
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades	960 Cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades	10 Unidades
2- Conjugado 1	1 Vial x 6 mL	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 30 mL	1 Vial x 60 mL
3- Lavado Concentrado	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL	1 Vial x 500 mL
4- Conjugado 2	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
5- Sustrato	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
6- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
7-Tampón de Elución en Papel Filtro	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
8- Control Negativo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades	5 Unidades
9- Control Positivo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades	5 Unidades

EQUIPOS Y INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en la tabla anterior.

Materiales necesarios no contenidos en el kit:

1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 50 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- Lavador de microplacas para técnica sobre papel filtro.
4- Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 620 nm de longitud de onda.
5- Papel absorbente para secar las microcavidades.
6- Cronómetro o reloj.
7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
8- Agua destilada o desionizada.
9- Herramientas de control de calidad.
10- Incubadora 37 ± 2 °C.
11- Trituradora de papel (diámetro 3 ± 0,2 mm).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

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

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.
3- El sobre que contiene la microplaca solo debe abrirse después de alcanzar la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de micropocillos no utilizadas en el sobre, selle y almacene a una temperatura de 2 a 8 °C.
4- El agua utilizada para la limpieza del material debe ser reciente 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, manéjelo con el debido cuidado.

7- Toda la materia prima del producto es testeada, siendo no reactiva para HBsAg y Anti-HIV. Sin embargo, estas pruebas no ofrecen una seguridad completa de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga una muestra biológica es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tomar las debidas precauciones de bioseguridad al manipular estos productos.
8- Pipetee siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre los micropocillos.
9- Como medida de protección, la placa debe estar cubierta durante la reacción.
10- Se debe asegurar que el fondo del pozo 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 el ensayo.
11- No exponer los reactivos, especialmente el Sustrato, a luz fuerte o vapores de hipoclorito durante las etapas de almacenamiento o incubación.
12- Recomendamos aplicar las normas locales, estatales y federales de protección ambiental para que la disposición de reactivos y material biológico se realice de acuerdo a la legislación vigente.
13- Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consulte la FISPQ (Ficha de Información de Seguridad de Productos Químicos) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o previa solicitud del SAC (Servicio de Asesoramiento al Cliente) de Quibasa.
14- No utilice el producto si el embalaje está dañado.
15- Es imperativo que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Sangre seca recogida en papel filtro (DBS) - EDTA o Punción

El papel filtro utilizado debe ser específico para la toma de muestras de sangre seca, como los modelos S&S 903 y Ahlstrom 226. El laboratorio debe certificar la calidad de las muestras antes de su uso. Las muestras de sangre secadas en papel de filtro se pueden almacenar hasta por 35 días a temperatura ambiente, siempre que estén protegidas de la luz solar directa y con poca humedad. Para almacenamiento de hasta 2 años, las muestras deben permanecer refrigeradas, entre 2 y 8 °C. El almacenamiento por un período superior a 2 años debe realizarse a una temperatura de -20 °C.⁷

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit BIOLISA HCV DBS es estable después de abrirlo hasta por 30 días. Esta estabilidad puede variar según la prueba y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado

Diluir el contenido de la ampolla N° 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 se puede almacenar entre 2 y 30 °C hasta por 30 días. Si ocurre cristalización, calentar a 37 °C hasta disolución.

Todos los demás reactivos están listos para usar.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos consultar con el SAC (Servicio de Asesoramiento al Cliente).

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

1- Separar los pocillos a utilizar teniendo en cuenta: Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recogidas en papel filtro (se recomienda realizar la prueba por duplicado). Devuelva las tiras de microplacas no utilizadas al paquete sellado original.
2- Separar la primera cavidad de Blanco (OPCIONAL).
3- Añadir un disco de 3 mm de Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recogidas en papel filtro, previamente perforado, en los pocillos determinados.

4- Pipetee 50 µL de Tampón de Elución en todos los pocillos, **incluido en la cavidad del Blanco**.
5- Pipetear 50 µL de Conjugado 1, **incluido en la cavidad del Blanco**.
6- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con sellador de placas.
7- Incubar durante 60 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
8- Después de la incubación, desechar el contenido de los pocillos por aspiración (Lavadora propia para la técnica del papel filtro). Use aproximadamente 300 µL de Solución de Lavado, **previamente preparada**, y realice un total de cinco (5) ciclos de lavado. 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 malos resultados.
9- Pipetee 100 µL de Conjugado 2 en todos los pocillos, **incluido en la cavidad del Blanco**.
10- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
11- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
12- Retire el sellador de placas de los pocillos.
13- Repetir el punto 8.
14- Pipetear 100 µL de Sustrato en todos los pozos, **incluido en la cavidad del Blanco**.
15- Homogeneizar 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- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.
20- Lectura con doble filtro: 450 nm / 620 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique si los resultados obtenidos para la lectura del Blanco y los Controles son compatibles con los valores que se muestran a continuación:

ITEM	ABSORBÁNCIAS
Blanco	< 0,120
Control Negativo DBS	< 0,120
Control Positivo DBS	> 0,500

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

CÁLCULOS

CUALITATIVO

Calcule Cut Off de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cut Off = Absorbancia media del Control Negativo DBS + 0,070.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBÁNCIAS
Control Negativo DBS	0,054
	0,057
Cut Off = (Absorbancia Media del Control Negativo DBS) + 0,070	((0,054 + 0,057) / 2) + 0,070 = 0,126

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

Ejemplo:

ITEM	ABSORBÁNCIAS
Muestra	1,023
Valor de Cut Off	0,126
Índice = Muestra / Valor de Cut Off	1,023 / 0,126 = 8,12

Nota: Los datos que se muestran en los ejemplos son solo ilustrativos y no se pueden utilizar para el cálculo de resultados. Cada laboratorio debe validar el Cut Off de acuerdo con la instrumentación utilizada y la población investigada.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

RESULTADOS	CUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo (Não Reactivo)	≤ 0,8
Indeterminado	0,8 y 1,2
Positivo (Reactivo)	≥ 1,2

Notas: En caso de resultados indeterminados, la muestra debe volver a analizarse por duplicado. Las muestras que arrojan resultados indeterminados repetidamente deben volver a analizarse con un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra en dos semanas. Prevalecerá el resultado de la última muestra recogida. La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en una sola prueba. Se deben incluir pruebas de confirmación adicionales 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 de realizar un diagnóstico descriptivo de la enfermedad. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en una sola prueba. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible antes del diagnóstico definitivo. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

INTERFERENTES

No se observaron interferencias para Triglicéridos hasta 1500 mg/dL, Ácido acetilsalicílico hasta 20 mg/dL, Ácido ascórbico hasta 2 g/dL, Creatina hasta 200 mg/dL, Bilirrubina hasta 1 g/dL, Albúmina hasta 10 g/dL, Hemoglobina hasta 1000 mg/dL, Ácido oxálico hasta 60 mg/dL, Fator Reumatoide hasta 980 UI/mL, Proteína C Reactiva hasta 41,2 mg/dL y Antiestreptolisina O hasta 1023 UI/mL.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio de reactividad cruzada, evaluando 88 muestras negativas para HCV pero positivas para otras infecciones. Entre ellos 5 muestras positivas para HIV, 9 muestras positivas para HTLV, 9 muestras positivas para Sífilis, 9 muestras positivas para HBsAg, 10 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 6 muestras positivas para Zika, 10 muestras positivas para CMV, 10 muestras positivas para Rubéola, 10 muestras positivas para Toxoplasmosis y 10 muestras positivas para SARS-CoV-2. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para HIV, HTLV, Sífilis, HBsAg, Enfermedad de Chagas, Zika, CMV, Rubéola, Toxoplasmosis y SARS-CoV-2. Apesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

RENDIMIENTO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad

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

Repetibilidad	Muestra		
	1	2	3
Promedio	2,159	1,709	0,038
Desvío Patrón	0,049	0,067	0,007
Coefficiente de Variación (%)	2,26	3,94	18,51

Reproducibilidad

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

Reproducibilidad	Muestra		
	1	2	3
Promedio	2,340	1,899	0,042
Desvío Patrón	0,135	0,081	0,006
Coefficiente de Variación (%)	5,68	4,33	14,86

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

El kit BIOLISA HCV 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 HCV DBS es >99,9 % y la especificidad clínica es del 99,43 %.

		Resultado Referência		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA HCV DBS	Positivo	83	1	84
	Negativo	0	175	175
	Total	83	176	259

Sensibilidad Clínica: >99,9% (83/83) - IC 95% = 95,7 a 100%.

Especificidad Clínica: 99,4% (175/176) - IC 95% = 96,9 a 100%.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

La Hepatitis C, anteriormente denominada Hepatitis no A y no B, es una enfermedad causada por la transmisión parenteral del virus de la Hepatitis C (HCV). El HCV es un virus envuelto que consta de una sola molécula de RNA en su genoma, que codifica 3 proteínas estructurales (una proteína de la cápside, o núcleo, y dos proteínas de la envoltura, E1 y E2) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). Las principales vías de transmisión del virus son las transfusiones de sangre y hemoderivados, el trasplante de órganos y el intercambio de agujas y jeringas contaminadas. La mayoría de los casos de infección por el HCV son asintomáticos y alrededor del 15 al 20% tienen síntomas inespecíficos como fatiga, pérdida de apetito, pérdida de peso, fiebre y dolor abdominal. Alrededor del 50 al 80% de los casos de infección por HCV se vuelven crónicos y pueden progresar a fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular. El diagnóstico serológico de la Hepatitis C es el primer paso para identificar a los individuos infectados, y el diagnóstico precoz es el principal medio para reducir la morbilidad y mortalidad causada por el HCV.

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- Warkad, S. D. et al. Developments in the HCV Screening Technologies Based on the Detection of Antigens and Antibodies. Sensors. 2019;19;4257.
- 4- Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelas Hepatites Virais. 2018.
- 5- Van der Poel, C. L., H.T.M. Cuypers, H.W. Reesink, and P.N.Lelie. Confirmation of Hepatitis C Virus Infection by New Four-antigen Recombinant Immunoblot Assay. Lancet. 1991;337:317.
- 6- Wilber, J.C. Development and Use of Laboratory Tests for Hepatitis C Infection: A Review. J. Clinical Immunoassay. 1993;16:204.
- 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 ser liberados para el consumo, todos los reactivos de **Bioclin** son probados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está garantizada hasta la fecha de caducidad indicada en el envase de presentación, siempre que se almacenen y transporten en condiciones adecuadas.



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 AL CONSUMIDOR

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

Número de Registro del kit BIOLISA HCV DBS en la ANVISA:
10269360435

Revisión: Julio/2023

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

NUMERO DE CATALOGO

NUMERO DE LOTE

FABRICADO POR

FECHA DE FABRICACIÓN

FECHA DE VALIDEZ
(último día del mes)

LÍMITE DE TEMPERATURA
(tienda)

EL CONTENIDO ES SUFICIENTE
PARA <N> PRUEBA

VER INSTRUCCIONES
DE USO

PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO
IN VITRO

PROTEGER DE
LUZ Y CALOR

NO REUTILIZA

PRECAUCIÓN

CONTROLAR

CONTROL POSITIVO

CONTROL NEGATIVO

RIESGO BIOLÓGICO

INFLAMABLE

CORROSIVO

TÓXICO

NO UTILICE SI EL
EMBALAJE ESTÁ
DAÑADA

PRODUCTO
ESTERILIZADO

PELIGRO

BIOLISA HCV DBS

REF K245

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION

Test for qualitative determination of Total Antibodies against the Hepatite C Virus (HCV) in **dried blood spot collected on filter paper (DBS)**. For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzyme.
BIOLISA HCV DBS is a solid-phase immunoenzymatic assay, based on the "sandwich" principle, for the qualitative detection of Antibodies against Hepatitis C Virus (HCV) in dried blood spot collected on filter paper. The microplate is coated with HCV Recombinant Antigens (Core, NS3, NS4 and NS5). At first, the dried blood spot is eluted by the Elution Buffer and incubated with Conjugate 1, consisting of HCV Recombinant Antigens conjugated to Biotin. Anti-HCV Antibodies present in the sample bind to HCV Antigens immobilized on the microplate and to biotinylated Antigens present in Conjugate 1, forming the Antigen-Antibody-biotinylated Antigen immunocomplex. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Conjugate 2, consisting of Streptavidin conjugated to Peroxidase, is added to the microplate, which is then incubated. Streptavidin binds to biotinylated Antigens, in turn bound to Anti-HCV Antibodies. A new wash is carried out to remove the excesses. After this step, the Substrate is added and incubated, producing a blue color that indicates the detection of Anti-HCV Antibodies present 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- Sensitized Plate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Plate sensitized with HCV Recombinant Antigens.
- 2- Conjugate 1** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution containing HCV Recombinant Antigens linked to Biotin, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
- 3- 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.
- 4- Conjugate 2** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution containing Streptavidin linked to Peroxidase, surfactant, stabilizers, dye 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: 1 M Hydrochloric Acid.
- 7- Elution Buffer on Filter Paper** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution, surfactant, stabilizer and preservative.
- 8- DBS Negative Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Non-Reactive Sample for Total Anti-HCV Antibody impregnated on filter paper. **Potentially infective.**
- 9- DBS Positive Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Reagent Sample for Total Anti-HCV Antibody impregnated on filter paper. **Potentially infective.**

PRESENTATION

REAGENTS	1	2	3	4
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities	960 Cavities
1- Sensitized Plate	1 Unit	2 Units	5 Units	10 Units
2-Conjugated 1	1 Vial x 6 mL	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 30 mL	1 Vial x 60 mL
3-Concentrated Washing	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL	1 Vial x 500 mL
4- Conjugated 2	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
5- Substrate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
6- Stop Solution	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
7-Elution Buffer on Filter Paper	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL	1 Vial x 120 mL
8- DBS Negative Control	1 Unit	2 Units	3 Units	5 Units
9- DBS Positive Control	1 Unit	2 Units	3 Units	5 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:

- Reagents described in the table above.

Required materials not contained in the kit:

- Pipettes capable of dispensing volumes from 50 to 500 µL with a coefficient of variation less than 1.5%.
- Repeater for repetitive pipetting of volumes of 300 µL with coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- Microplate washer for technique on filter paper.
- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 620 nm of wavelength.
- Absorbent paper to dry the microcavities.
- Stopwatch or watch.
- Bottle to store the Washing Solution after dilution.
- Distilled or deionized water.
- Quality Control Tools.
- Incubator 37 ± 2 °C.
- Paper shredder (diameter 3 ± 0.2 mm).

STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

The storage temperature should be between 2 and 8°C. Transport at temperatures up to 30°C should not exceed 5 days. Keep away from light and avoid moisture. **Do not freeze.**

SPECIAL CARES

- For *in vitro* diagnostic use only.**
- Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- The sachet containing the microplate should only be opened after reaching room temperature. Replace the unused microwell strips in the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
- The water used to clean the material must be recent and free of contaminants.
- Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
- The Stop Solution contains Hydrochloric Acid which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.

- All raw material of the product is tested, being non-reactive for HBsAg and Anti-HIV. However, these tests do not offer complete assurance of the absence of infectious agents. Handling any product that contains a biological sample is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, it is necessary to take the proper biosafety precautions when handling these products.
- Always pipette the reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between the microwells.
- As a protection measure, the plate must be covered during the reaction.
- It must be ensured that the bottom of the well is clean and dry and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the assay.
- Do not expose the reagents, especially the Substrate, to strong light or hypochlorite vapors during storage or incubation steps.
- We recommend applying the local, state and federal norms for environmental protection so that the disposal of reagents and biological material is carried out in accordance with current legislation.
- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by QUIBASA's SAC (Customer Advisory Service).
- Do not use the product if the packaging is damaged.
- It is imperative that the instruments and equipment used are properly calibrated and submitted to periodic maintenance.

SAMPLES

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

The filter paper used must be specific for collecting dried blood spot, such as the S&S 903 and Ahlstrom 226 models. The laboratory must certify the quality of the samples before use.
Blood samples dried on filter paper can be stored for up to 35 days at room temperature, provided they are protected from direct sunlight and in low humidity. For storage of up to 2 years, the samples must remain refrigerated, between 2 and 8 °C. Storage for a period longer than 2 years must be carried out at a temperature of -20 °C.⁷

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Opening

The results of the stability test prove that the BIOLISA HCV DBS kit is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary according to test and environmental conditions. Therefore, it is suggested to monitor the performance of the product using the kit's internal controls and the technique validation criteria.

PREPARATION OF WORKING 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.

All other reagents are ready to use.

TECHNIQUE

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

Before starting the assay, place all Reagents, Samples and Controls to stabilize at room temperature (15 – 30 °C) for at least 40 minutes.

- Separate the wells to be used considering: DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood spot collected on filter paper (it is recommended to test in duplicate). Return unused microplate strips to the original sealed package.
- Separate the first cavity for the Blank (OPTIONAL).
- Add a 3 mm disk of DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood spot collected on filter paper, previously perforated, in the determined wells.

- Pipette 50 µL of Elution Buffer into all wells, **including the Blank well.**
- Pipette 50 µL of Conjugate 1, **including in the Blank well.**
- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover wells with plate sealer.
- Incubate for 60 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- After incubation, discard the contents of the wells by aspiration (Washer suitable for the filter paper technique). Use approximately 300 µL of Washing Solution, **previously prepared**, and perform a total of five (5) wash cycles. To guarantee the drying of the plate, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
- Poor washing/drying may cause poor results.
- Pipette 100 µL of Conjugate 2 into all wells, **including the Blank well.**
- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- Remove the plate sealer from the wells.
- Repeat item 8.
- Pipette 100 µL of Substrate in all wells, **including the Blank well.**
- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- Remove the plate sealer from the wells.
- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
- Gently homogenize for ± 30 seconds.
- Read using double filter: 450 nm / 620 nm in up to 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	< 0.120
DBS Negative Control	< 0.120
DBS Positive Control	> 0.500

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

CALCULATIONS

QUALITATIVE

Calculate Cut Off according to the following formula:

Cut Off = Mean Absorbance of DBS Negative Control + 0.070.

Example:

ITEM	ABSORBANCES
DBS Negative Control	0.054
	0.057
Cut Off = (DBS Negative Control Mean Absorbance) + 0.070	((0.054 + 0.057) / 2) + 0.070 = 0.126

Calculate the Index by dividing the Sample absorbance by the Cut Off value.

Example:

ITEM	ABSORBANCES
Sample	1.023
Cut Off Value	0.126
Index = Sample / Cut Off Value	1.023 / 0.126 = 8.12

Note: Data shown in examples is for illustration only and cannot be used for calculation of results. Each laboratory must validate the cut-off according to the instrumentation used and the researched population.

INTERPRETATION OF RESULTS

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

RESULTS	QUALITATIVE
	INDEX
Negative (Non-Reagent)	≤ 0.8
Undetermined	0.8 and 1.2
Positive (Reagent)	≥ 1.2

Notes: In case of indeterminate results, the sample must be reanalyzed in duplicate. Samples that give repeatedly indeterminate results should be retested using an alternate method. If results remain indeterminate, a new sample should be collected in two weeks. The result of the last sample collected shall prevail. The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single test. Additional confirmatory tests must be included before a specimen 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, prior to making a descriptive diagnosis of the disease. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, not being the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

PROCESS LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single test. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information prior to definitive diagnosis. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, not being the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

INTERFERING

No interference was observed for Triglycerides up to 1500 mg/dL, Acetylsalicylic Acid up to 20 mg/dL, Ascorbic Acid up to 2 g/dL, Creatine up to 200 mg/dL, Bilirubin up to 1 g/dL, Albumin up to 10 g/dL, Hemoglobin up to 1000 mg/dL, Oxalic Acid up to 60 mg/dL, Rheumatoid Factor up to 980 IU/mL, C-Reactive Protein up to 41.2 mg/dL and Anti Streptolysin O up to 1023 IU/mL.

CROSS REACTIVITY

A cross-reactivity study was performed, evaluating 88 samples negative for HCV but positive for other infections. Among them 5 positive samples for HIV, 9 positive samples for HTLV, 9 positive samples for Syphilis, 9 positive samples for HBsAg, 10 positive samples for Chagas Disease, 6 positive samples for Zika, 10 positive samples for CMV, 10 positive samples for Rubella, 10 positive samples for Toxoplasmosis and 10 positive samples for SARS-CoV-2. No cross-reactivity was observed with positive samples for HIV, HTLV, Syphilis, HBsAg, Chagas Disease, Zika, CMV, Rubella, Toxoplasmosis and SARS-CoV-2. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. 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 point out that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. For that, it is recommended the use of controls, which allow evaluating 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	2.159	1.709	0.038
Standard Deviation	0.049	0.067	0.007
Coefficient of Variation (%)	2.26	3.94	18.51

Reproducibility

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

Reproducibility	Sample		
	1	2	3
Average	2.340	1.899	0.042
Standard Deviation	0.135	0.081	0.006
Coefficient of Variation (%)	5.68	4.33	14.86

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The BIOLISA HCV 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 HCV DBS kit is >99.9% and the clinical specificity is 99.43%.

		Result Reference		
		Positive	Negative	Total
BIOLISA HCV DBS	Positive	83	1	84
	Negative	0	175	175
	Total	83	176	259

Clinical Sensitivity: >99.9% (83/83) - CI 95% = 95.7 to 100%.

Clinical Specificity: 99.4% (175/176) - CI 95% = 96.9 to 100%.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Hepatitis C, formerly called non-A and non-B hepatitis, is a disease caused by parenteral transmission of the Hepatitis C Virus (HCV). HCV is an enveloped virus consisting of only one RNA molecule in its genome, which encodes 3 structural proteins (a capsid protein, or core, and two envelope proteins, E1 and E2) and 7 non-structural proteins (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B). The main routes of transmission of the virus are through transfusion of blood and blood products, organ transplantation and sharing of contaminated needles and syringes. Most cases of HCV infection are asymptomatic and about 15 to 20% have nonspecific symptoms such as fatigue, loss of appetite, weight loss, fever and abdominal pain. About 50 to 80% of cases of HCV infection become chronic and may progress to liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Serological diagnosis of Hepatitis C is the first step towards identifying infected individuals, and early diagnosis is the main means of reducing morbidity and mortality caused by HCV.

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- Warkad, S. D. et al. Developments in the HCV Screening Technologies Based on the Detection of Antigens and Antibodies. Sensors. 2019;19:4257.
- 4- Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelas Hepatites Virais. 2018.
- 5- Van der Poel, C. L., H.T.M. Cuypers, H.W. Reesink, and P.N.Lelie. Confirmation of Hepatitis C Virus Infection by New Four-antigen Recombinant Immunoblot Assay. Lancet. 1991;337:317.
- 6- Wilber, J.C. Development and Use of Laboratory Tests for Hepatitis C Infection: A Review. J. Clinical Immunoassay. 1993;16:204.
- 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 guaranteed until the expiry date mentioned on the presentation packaging, provided they are 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.: (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 the BIOLISA HCV DBS kit at ANVISA:
10269360435

Review: July/2023

UNIVERSAL SYMBOLOGY



CATALOG NUMBER



LOT NUMBER



MANUFACTURING DATE



VALIDITY DATE
(last day of the month)



TEMPERATURE LIMIT
(store)



CONTENT IS SUFFICIENT
FOR <N> TEST



SEE INSTRUCTIONS
FOR USE



IN VITRO DIAGNOSTIC
PRODUCT



KEEP AWAY
FROM SUNLIGHT



DO NOT REUSE



CAUTION



MADE BY



CONTROL



POSITIVE CONTROL



NEGATIVE CONTROL



BIOLOGICAL RISK



FLAMMABLE



CORROSIVE



TOXIC



DO NOT USE IF
PACKAGE IS
DAMAGED



PRODUCT
STERILIZED



DANGER