

BIOLISA ANTI HBs

REF K121INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para a detecção quantitativa de anticorpos anti antígeno de superfície de vírus da Hepatite B em soro ou plasma humano, por enzaimaimunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzaimaimunoensaio ou imunoenzimática

O kit BIOLISA Anti HBs é um ensaio imunoenzimático quantitativo em fase sólida baseado no princípio “sanduíche” para a detecção de anticorpos Anti-HBs incluindo anticorpos IgG, IgM e IgA em soro ou plasma humano. A microplaca é revestida com HBsAg recombinante. Durante o teste, amostra e conjugado são adicionados à microplaca revestida com antígeno e então incubados. Se a amostra contiver anticorpos Anti-HBs, este se ligará ao antígeno que reveste a microplaca, e simultaneamente se ligarão ao conjugado para formar complexos Antígeno-Anti HBS-Conjugado. Após a incubação, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Após esta etapa, os Substratos A e B são adicionados e, em seguida, incubados produzindo uma cor azul, que indica a quantidade de anticorpos Anti-HBs presente na amostra. Uma Solução de Parada é adicionada para interromper a reação havendo uma mudança de cor para amarelo, medida com um leitor de microplacas.

REAGENTES

- 1- Padrões Referência (A - E)** - Conservar entre 2 e 8°C. Cinco (5) frascos (A - E) de Padrões Referência contendo anticorpos anti-antígenos de superfície de vírus da Hepatite B em diferentes concentrações em solução de tampão, estabilizante e conservante. **Potencialmente infectante. As concentrações dos Padrões Referência (A - E) varia a cada lote. Vide rótulo dos frascos.**
- 2- Conjugado** - Conservar entre 2 e 8°C. Anticorpo anti-IgG humano ligado a Peroxidase, estabilizante e conservante.
- 3- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 e 8°C.
- 4- Lavagem Concentrada** - Conservar entre 2 e 8°C. Solução tampão, surfactante e conservante.
- 5- Substrato A** - Conservar entre 2 e 8°C. Solução contendo Tetrametilbenzidina (TMB).
- 6- Substrato B** - Conservar entre 2 e 8°C. Solução contendo Peróxido de Uréia.
- 7- Solução de Parada** - Conservar entre 2 e 8°C. Ácido Sulfúrico 1N.
- 8- Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Padrões Referência	1 Frasco (A- E) x 1 mL	2 Frascos (A- E) X 1 mL	4 Frascos (A- E) X 1 mL
2- Conjugado	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos x 8 mL	5 Frascos x 8 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidade (96 cavidades)	2 Unidades (96 cavidades)	5 Unidades (96 cavidades)
4- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	2 Frascos x 50 mL	5 Frascos x 50 mL
5- Substrato A	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos x 8 mL	5 Frascos x 8 mL
6- Substrato B	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos x 8 mL
7- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
8- Seladores de Placa	3 Unidades	5 Unidades	10 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no item anterior
- Instruções de Uso (manual)

Materiais necessários, não contidos nos kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5, 50 e 100 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
- 2- Repipetadores para pipetagens repetitivas de volumes de 100 µL e 300 µL, com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450/630 nm de comprimento de onda.
- 5- Pipetas com volumes reguláveis (200 µL a 1000 µL) para preparação do Substrato.
- 6- Tubos de ensaio para a preparação dos Substratos A e B.
- 7- Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8- Cronômetro ou relógio.
- 9- Frasco para estocar a Solução de Lavagem, após diluída.
- 10- Água destilada ou deionizada.
- 11- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 12- Incubadora de 37°C ± 2°C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte pode ser feito sob temperatura ambiente (até 30°C) por até 72 (setenta e duas) horas. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- **Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.**
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
- 3- O envelope contendo as tiras deve ser aberto somente após atingirem a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, 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- Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para Anti-HIV 1 & 2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual 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.
- 7- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 8- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.
- 9- 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.
- 10- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante armazenamento ou etapas de incubação.
- 11- A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico, que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com o devido cuidado.
- 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

Utilizar soro ou plasma (EDTA ou Heparina). Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C , pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer).

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco Nº 4 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 a 30°C até a data de validade impressa no frasco original. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37°C até dissolução.

Substrato - Solução de Trabalho

Determinar a quantidade de cavidades que serão utilizadas para preparo de um volume adequado. Preparar a solução misturando partes iguais de Substrato A e Substrato B, 15 minutos antes de sua utilização. Mantenha-o protegido da luz até ser utilizado. Para cada microcavidade (teste), utilizar: **50µL de Substrato A + 50µL de Substrato B** Por exemplo: Misture 1 mL de Substrato A e 1 mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes). Ocorre sobra de reagente. **Usar no máximo até uma (1) hora após preparo.**

TÉCNICA

- Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os Reagentes, Amostras e Padrões Referência para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30°C) por no mínimo 40 minutos. Retornar as tiras da microplaca que não serão utilizadas para a embalagem original selada.
- 1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Padrões Referência e Amostras (podendo ser testados em duplicata).
 - 2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
 - 3- Pipetar 50 µL dos Padrões Referência (A - E) e Amostras nas cavidades determinadas.
 - 4- Pipetar 50 µL de Conjugado em todas as cavidades exceto na cavidade Branco (caso tenha feito a opção de usar o Branco).
 - 5- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
 - 6- Incubar por 60 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.
 - 7- Retirar o selador de placa das cavidades.
 - 8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (manual).

Usar 350 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada***, para um total de oito (8) ciclos de lavagem.

Ou

Usar 500 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada***, para um total de seis (6) ciclos de lavagem (exclusivo para equipamentos automáticos).

Nota: Avaliar a capacidade de aspiração e dispensação do equipamento. Para garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

9- ATENÇÃO Siga um dos seguintes procedimentos:

A) Pipetar 100 µL de Substrato **previamente preparado*** - Solução de Trabalho (A + B) em todas as cavidades.

*Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Ou

B) Pipetar 50 µL de Substrato A em todas cavidades.

Pipetar 50 µL de Substrato B em todas cavidades.

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

11- Incubar por 30 minutos ± 1 minuto em temperatura ambiente (15 - 30°C) ao abrigo da luz.

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

13- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

14- Ler: 450 nm (filtro primário) / 630 nm (filtro secundário) em até 30 minutos (no máximo).

CÁLCULOS

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

Preparo da Curva de Calibração

Registrar as absorbâncias obtidas na Leitora de microplaca, como apresentado no exemplo 1. Calcular as médias das duplicatas, caso sejam realizadas duplicatas.

Plotar as absorbâncias médias de cada Padrão Referência versus a concentração correspondente em mUI/mL em papel milimetrado (antes de plotá-las no gráfico). Traçar a curva.

Nota: Os dados apresentados no exemplo 1 são apenas para ilustração e não podem ser usados em substituição à curva de calibração, que deve ser construída no laboratório.

Exemplo 1

PADRÕES	ABSORBÂNCIA	ABSORBÂNCIA MÉDIA	CONCENTRAÇÃO
A	0,026	0,027	0,0 mUI/mL
A	0,029		
B	0,101	0,102	10,0 mUI/mL
B	0,103		
C	0,660	0,665	100,0 mUI/mL
C	0,670		
D	1,700	1,734	300,0 mUI/mL
D	1,768		
E	2,214	2,217	500,0 mUI/mL
E	2,220		

Nota: As amostras que tenham absorbância acima do Padrão Referência devem ser pré-diluídas e testadas novamente. A concentração deve ser multiplicada pelo fator de diluição. Leitura automática e cálculo podem ser realizados através da função de regressão linear em programas adequados de computador.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Não Reativo: Amostras com concentração menor que 10 mUI/mL, são consideradas negativas para Anti-HBs.

Reativo: As amostras com concentração superior a 10 mUI/mL são consideradas positivas para Anti-HBs.

Nota: No caso de resultado entre 9 e 11 mUI/mL, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente entre 9 e 11 mUI/mL devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados se confirmarem, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada.

Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

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

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. Enfim, todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis.

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.

PARÂMETRO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Absorbância do Padrão Referência E (500 mUI/mL) ≥ 1,2.

DESEMPENHO DO PRODUTO
CONTROLE DE QUALIDADE

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA
O kit BIOLISA Anti HBs foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente. Foram realizadas 07 análises e os resultados foram avaliados. A equação linear obtida foi Y = 0,866X + 4,516 e o coeficiente de correlação 0,999. Com estes resultados pode-se concluir que os kits apresentam boa especificidade metodológica.

Precisão

REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

REPETIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	401	23	104
Desvio Padrão	16,4	2,3	4,8
Coefficiente de Variação (%)	4,10	10,07	4,58

REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

REPRODUTIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	402,67	24,33	101,67
Desvio Padrão	3,79	1,15	2,08
Coefficiente de Variação (%)	0,94	4,75	2,05

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica é 1 mUI/mL.

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O kit BIOLISA Anti HBs analisou amostras clínicas em comparação com outros métodos de EIA. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA Anti HBs é > 99,9% e a especificidade clínica é de 99,4%.

	TOTAL ESPERADO	BIOLISA ANTI HBs
Amostra Negativa	513	510
Amostra Positiva	213	213

Sensibilidade Clínica: > 99,9% (213/213)

Especificidade Clínica: 99,4% (513/510)

Linearidade

A reação é capaz de detectar concentrações até a concentração do ponto mais alto da curva de calibração. Para amostras com valores superiores, diluir a mesma, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

O vírus da Hepatite B é um vírus de envelope esférico, de DNA de cadeia dupla, da família Hepadnaviridae. A Hepatite B é transmitida através do contato sexual, exposição de sangue, transmissão de mãe para filho durante o parto ou partilha de objetos perfuro cortantes. A infecção pelo VHB tem sido associada a uma variedade de doenças do fígado de leve a crônica, incluindo cirrose, e carcinoma hepatocelular. Em alguns casos, o vírus pode persistir por toda a vida. Anualmente, 1 milhão de pessoas morrem de hepatite crônica ativa, cirrose ou câncer de fígado primário. A Hepatite B infecta milhões de pessoas no mundo inteiro e é considerado um problema de saúde pública. O HBsAg é um dos primeiros marcadores que aparecem no sangue após a infecção com o vírus da Hepatite B. A resposta imune à infecção inclui o desenvolvimento de anticorpos específicos para o HBsAg. Estes anticorpos aparecem poucas semanas após o HBsAg ser detectado no sangue, quando o vírus já não pode ser passado para outras pessoas. O aparecimento do Anti-HBs está associado com a recuperação

e é considerado o marcador para a imunidade. Estes anticorpos também aparecem como resultado de uma imunização de sucesso. Portanto, a detecção e monitoração de anticorpos contra o HBsAg tornou-se uma importante ferramenta na triagem e no acompanhamento dos indivíduos infectados, bem como um indicador de sucesso dos vacinados contra o VHB.

NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 - 96 testes

Apresentação 2 - 192 testes

Apresentação 3 - 480 testes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frank Fenner and David O. White, Medical Virology, 4th Edition, Academic Press, 1994.
2. Centers for Disease Control. Viral Hepatitis B Fact Sheet.
3. Richman, D., R. Whitley, F. Hayden.Clinical Virology. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997.
4. World Health Organization. World Health Organization Hepatitis B Fact Sheet. N°204.Revised October 2000.
5. World Health Organization. Hepatitis B. 2002.
6. Bioclin - Dados de arquivos.

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 - Fax: (31) 3439.5455

E-mail: bioclin@bioclin.com.br

CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 0315454

e-mail: sac@bioclin.com.br

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

Revisão: Agosto/2019

SIMBOLOGIA UNIVERSAL



NÚMERO DE CATÁLOGO



NÚMERO DO LOTE



DATA DE FABRICAÇÃO



DATA DE VALIDADE
(último dia do mês)



LIMITE DE TEMPERATURA
(conservar a)



O CONTEÚDO É SUFICIENTE
PARA <N> TESTES



CONSULTAR INSTRUÇÕES
DE USO



PRODUTO PARA
DIAGNOSTICO IN VITRO



REPRESENTANTE
EUROPEU AUTORIZADO



PROTEGER DA
LUZ E CALOR



FABRICADO POR



CONTROLE



CONTROLE POSITIVO



CONTROLE NEGATIVO



RISCO BIOLÓGICO



INFLÁMVEL



CORROSIVO



TÓXICO



MARCA CE



NÃO UTILIZAR SE A
EMBALAGEM ESTIVER
DANIFICADA

BIOLISA ANTI HBs

[REF] K121

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Test para la detección cuantitativa de anticuerpos anti antígeno de superficie de virus de Hepatitis B en suero o plasma humano, por enzimm inmuensayo, en microplaca. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimm inmuensayo o inmuoenzimatica
El kit BIOLISAAnti HBs es un ensayo inmuoenzimático cuantitativo en fase sólida basado en el principio “sándwich” para la detección de anticuerpos Anti- HBs incluyendo anticuerpos IgG, IgM e IgA en suero o plasma humano. La microplaca es revestida con HBsAg recombinante. Durante el test, muestra y conjugado son adicionados em la microplaca recubierta con el antígeno y después incubada. Si la muestra contiver anticuerpos Anti-HBs, esto se ligará al antígeno de recubrimiento de la placa, y unirse simultáneamente al conjugado para formar complejos de Antígeno-Anti-HBs-Conjugado. Después de la incubación, la microplaca es lavada para remover los materiales no ligados. Luego de esta etapa, los Sustratos A y B son adicionados y, en seguida, incubados produciendo un color azul, que indica la cantidad de anticuerpos Anti-HBs presente en la muestra. Uma Solución de Parada es adicionada para interrumpir la reacción ocurriendo un cambio de color para amarillo, medido con un lector de microplacas.

REACTIVOS

1- Patrones Referencia (A - E) - Almacenar entre 2 y 8°C. Cinco (5) frascos (A - E) de Patrones Referencia conteniendo anticuerpos anti-antígenos de superficie de virus de Hepatitis B en diferentes concentraciones en solución de tapón, estabilizador y conservante. **Potencialmente infectante.**
Las concentraciones de los Patrones Referencia (A - E) varía la cada lote. Ved rótulo de los frascos.
2- Conjugado - Almacenar entre 2 y 8°C. Anticuerpo anti-IgG humano ligado la Peroxidasa, estabilizador y conservante.
3- Placa Sensibilizada - Almacenar entre 2 y 8°C.
4- Lavado Concentrado - Almacenar entre 2 y 8°C. Solución tapón, surfactante y conservante.
5- Sustrato A - Almacenar entre 2 y 8°C. Solución conteniendo Tetrametilbenzidina (TMB).
6- Sustrato B - Almacenar entre 2 y 8°C. Solución conteniendo Peróxido de Urea.
7- Solución de Parada - Almacenar entre 2 y 8°C. Ácido Sulfúrico 1N.
8- Selladores de Placa

PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Patrones Referencia	1 Frasco (A - E) X 1 mL	2 Frascos (A - E) X 1 mL	4 Frascos (A - E) X 1 mL
2- Conjugado	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
3- Placa Sensibilizada	1 Unidad (96 cavidades)	2 Unidades (96 cavidades)	5 Unidades (96 cavidades)
4- Lavado Concentrado	1 Frasco x 50 mL	2 Frascos x 50 mL	5 Frascos x 50 mL
5- Sustrato A	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos x 8 mL	5 Frascos x 8 mL
6- Sustrato B	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos x 8 mL	5 Frascos x 8 mL
7- Solución de Parada	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
8- Selladores de Placa	3 Unidades	5 Unidades	10 Unidades

EQUIPOS E INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el cuadro anterior
- Instrucciones de Uso (manual)

Materiales necesarios, no contenidos en los kit:

1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 5, 50 y 100 µL con menor coeficiente de variación que 1,5%.
2- Repipetadores para pipetajes repetitivos de volúmenes de 100 µL y 300 µL, con menor coeficiente de variación que 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
3- Lavadora de microplaca (opcional).
4- Lectora de ELISA con capacidad de absorbancia en 450/630 nm de longitud de onda.
5- Pipetas con volúmenes regulables (200 µL a 1000 µL) para preparación del Sustrato.
6- Tubos de ensayo para la preparación de los Sustratos A y B.
7- Papel absorbente para secar las microcavidades.
8- Cronómetro o reloj.
9- Frasco para almacenar la Solución de Lavado, después de diluida.
10- Agua destilada o deionizada.
11- Herramientas de Control de calidad.
12- Incubadora de 37°C ± 2°C.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento deberá ser de 2 a 8°C. El transporte puede realizarse a temperatura ambiente (até 30°C) durante un maximo de 72 (setenta y dos) horas. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro* profesional.
2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.
3- El sobre conteniendo las tiras debe ser abierto solamente luego que alcancen la temperatura ambiente. Recolocar las tiras de microcavidades no utilizadas en la envoltura de aluminio, sellar y almacenar entre 2 y 8°C.
4- El agua utilizada en la limpieza del material debe ser reciente e exenta de contaminantes.
5- Columnas deionizadoras saturadas liberan agua alcalina, iones diversos y agentes oxidantes y reductores, que pueden alterar de forma significativa los resultados.
6- Toda materia prima del producto es analizada y debe ser no reactivo para Anti-HIV 1 & 2 y Anti-HCV. Sin embargo, esos tests no ofrecen total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación manual de todo producto que contiene suero es potencialmente capaz de transmitir dolencias. Por lo tanto, es necesario tomar los debidos cuidados de bioseguridad en la manipulación de esos productos.
7- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.
8- Por medida de protección, debe cubrir la placa durante la reacción.
9- Asegurar que el fondo de la cavidad este limpio y seco y que no hayan burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permitir que las cavidades sequen durante el ensayo.
10- No exponga los reactivos, especialmente el Sustrato, a la luz fuerte o vapores de Hipoclorito durante el almacenamiento o etapas de incubación.
11- La Solución de Parada contiene Ácido Sulfúrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manosearlo con el debido cuidado.
12- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.
13- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.
14- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.
15- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

Utilizar suero o plasma (EDTA o Heparina). Muestras hemolizadas o altamente lipémicas no deben ser usadas. Las muestras pueden ser almacenadas bajo refrigeración, entre 2 y 8°C, por el período de máximo 5 días. Si las muestras no pudieran ser analizadas dentro de 5 días, pueden ser almacenadas por hasta 30 días a temperatura de -20°C (freezer).

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado

Diluir el contenido del frasco N° 4 (Solución de Lavado Concentrado) en 1000 mL de agua destilada o deionizada. Despues de la preparación de la solución se puede almacenar a 2 a 30°C hasta la fecha de validez impresa en el frasco original. Puede ser almacenada a temperatura ambiente. Caso ocurra cristalización, calentar a 37°C hasta su disolución.

Sustrato - Solución de Trabajo

Determinar la cantidad de cavidades a ser utilizadas para el preparo de un volúmen adecuado. Preparar la solución mezclando partes iguales del Sustrato A y Sustrato B, 15 minutos antes de su utilización. Manténgalo protegido de la luz hasta ser utilizado.
Para cada microcavidad (test), utilizar:
50 µL de Sustrato A + 50 µL de Sustrato B
Por ejemplo: Mezcle 1 mL de Sustrato A y 1mL de Sustrato B para dos tiras de 8 microcavidades (16 tests).Ocurre sobra de reactivo.
Usar máximo hasta una (1) hora luego del preparo.

TÉCNICA

Antes de iniciar el ensayo, colocar todos los Reactivos, Muestras y Patrones Referencia para que se establezcan en temperatura ambiente (15 - 30°C) por lo mínimo 40 minutos.
Retornar las tiras de la microplaca no utilizadas para el embalaje original sellado.
1- Separar las cavidades a ser utilizadas considerando: Patrones Referencia y Muestras. (pudiendo ser testados en duplicado).
2- Separar la primera cavidad para el Blanco (OPCIONAL).
3- Pipetear 50 µL de los Patrones Referencia (A - E) y Muestras en las cavidades previamente determinadas.
4- Pipetear 50 µL de Conjugado en todas las cavidades salvo en la cavidad Branco (caso haya hecho la opción de usar el Blanco).
5- Homogenizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cubrir las cavidades con el sellador de placa.
6- Incubar por 60 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37°C ± 2°C.
7- Retirar el sellador de placa de las cavidades.
8- Descartar el contenido de las cavidades por aspiración (Lavadora) o por decantación (manual).
Usar 350 µL aproximadamente de Solución de Lavado, **previamente preparada***, para efectuar un total de ocho (8) ciclos de lavado.
O

Utilizar 500 µL aproximadamente de Solución de Lavado, **previamente preparada***, para un total de seis (6) ciclos de lavado (exclusivo para equipos automáticos).

Nota: Evaluar la capacidad de aspiración y dispensación del equipo. Para la garantía del secado de la placa, al final del lavado, batir la placa por algunos segundos en papel absorbente.

9- ATENCIÓN Siga uno de los siguientes procedimientos:

A) Pipetear 100 µL de Sustrato **previamente preparado*** - Solución de Trabajo (A + B) en todas las cavidades.

***Ved PREPARO DE REACTIVOS DE TRABAJO**

O

B) Pipetear 50 µL de Sustrato A en todas las cavidades.

Pipetear 50 µL de Sustrato B en todas las cavidades.

10- Homogenizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placa.

11- Incubar por 30 minutos ± 1 minuto en temperatura ambiente (15 - 30°C) al abrigo de la luz.

12- Pipetear 100 µL de Solución de Parada en todas las cavidades.

13- Homogenizar gentilmente durante ± 30 segundos.

14- Leer: 450nm (filtro primario) / 630nm (filtro secundario) en hasta 30 minutos (máximo).

CÁLCULOS

Una curva de calibración es usada para determinar la concentración de Anti-HBs en muestras desconocidas.

Preparo de la Curva de Calibración

Registrar las absorbancias obtenidas en la Lectora de microplaca, como presentado en el ejemplo 1. Calcular los promedios de los duplicados, en caso sean realizados duplicados.
Plotear las absorbancias promedios de cada Patrón Referencia versus la concentración correspondiente en mUI/mL en papel milimetrado (antes de plotearlas en el gráfico).Trazar la curva.

Nota: Los datos presentados en el ejemplo 1 son apenas para ilustración y no pueden ser usados en sustitución a la curva de calibración, que debe ser construida en el laboratorio.

Ejemplo 1

PATRONES	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA PROMEDIO	CONCENTRACIÓN
A	0,026	0,027	0,0 mUI/mL
A	0,029		
B	0,101	0,102	10,0 mUI/mL
B	0,103		
C	0,660	0,665	100,0 mUI/mL
C	0,670		
D	1,700	1,734	300,0 mUI/mL
D	1,768		
E	2,214	2,217	500,0 mUI/mL
E	2,220		

Nota: Las muestras que tengan absorbancia mayor que el Patrón Referencia deben ser pre-diluidas y probadas nuevamente. La concentración debe ser multiplicada por el factor de dilución. Lectura automática y cálculo pueden ser realizados a través de la función de regresión linear en programas adecuados de computador.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

No Reactivo: Muestras con concentración menor que 10 mUI/mL, son consideradas negativas, para Anti-HBs.

Reactivo: Las muestras con concentración superior a 10 mUI/mL son consideradas positivas para Anti-HBs.

Nota: En caso de resultado entre 9 y 11 mUI/mL, la muestra debe ser reanalizada. Las muestras que obtuvieran resultados repetidamente entre 9 y 11 mUI/mL deben ser reanalizados utilizando un método alternativo. Si los resultados se confirmaran, se debe recoger una nueva muestra en dos semanas. Deve prevalecer el resultado de la ultima amostra recogida. 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.

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son sólo para ilustración y no se pueden utilizar para calcular o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de un test diagnóstico, no debe ser establecida con base en un único ensayo. Se deben incluir otros tests de confirmación, antes que una muestra sea considerada positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. En última instancia, todos los resultados deben ser interpretados en conjunto con otras informaciones clínicas disponibles.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe poseer un programa interno de control de calidad, donde procedimientos, normas, límites y tolerancia para variaciones sean claramente establecidos. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presentan una variabilidad analítica característica, que debe ser vigilada por los propios laboratorios. Por lo tanto, es recomendable la utilización de controles, que permiten la evaluación, la precisión y la exactitud de las dosificaciones.

PARÁMETRO DE CONTROL DE CALIDAD

Absorbancia del Patrone Referencia E (500 mUI/mL) ≥ 1,2.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

CONTROL DE CALIDAD

Exactitud

COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA

El kit BIOLISA Anti HBs fue comparado con otro método ELISA disponible comercialmente. Fueron realizadas 07 análisis y los resultados fueron evaluados. La ecuación lineal obtenida fue Y = 0,866X + 4,516 y el coeficiente de correlación 0,999. Con estos resultados se puede concluir que los kits presentan buena especificidad metodológica.

Precisión

REPETIBILIDAD

La repetibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

REPETIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	401	23	104
Desvío Patrón	16,4	2,3	4,8
Coefficiente de Variación (%)	4,10	10,07	4,58

REPRODUCTIBILIDAD

La reproductibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

REPRODUCTIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	402,67	24,33	101,67
Desvío Patrón	3,79	1,15	2,08
Coefficiente de Variación (%)	0,94	4,75	2,05

Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica es 1mUI/mL.

Sensibilidad y Especificidad Clínica

El kit BIOLISAAnti HBs analizó muestras clínicas en comparación con otros métodos de EIA. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA Anti HBs es > 99,9% y la especificidad clínica es de 99,4%.

	TOTAL ESPERADO	BIOLISA ANTI HBs
Muestra Negativa	513	510
Muestra Positiva	213	213

Sensibilidad Clínica: > 99,9% (213/213)

Especificidad Clínica: 99,4% (513/510)

Linealidad

La reacción es capaz de detectar concentraciones hasta la concentración del punto más alto de la curva de calibración. Para muestras con valores superiores, diluir la misma, repetir la dosis y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

El virus de la Hepatitis B es un virus de sobre esférico, de DNA de cadena doble, de la familia Hepadnaviridae. La Hepatitis B es transmitida a través del contacto sexual, exposición de sangre, transmisión de madre para hijo durante el parto o compartir objetos punzo cortantes. La infección por el VHB ha sido asociada a una variedad de dolencias del hígado de leve a crónica, incluyendo cirrosis, y carcinoma hepatocelular. En algunos casos, el virus puede persistir por toda la vida. Anualmente, 1 millón de personas mueren de hepatitis crónica activa, cirrosis o cáncer de hígado primario. La Hepatitis B infecta a millones de personas en el mundo entero y es considerado un problema de salud pública. El HBsAg es uno de los primeros marcadores que aparecen en la sangre después de la infección con el virus de la Hepatitis B. La respuesta inmune a la infección incluye

el desenvolvimiento de anticuerpos específicos para el HBsAg. Estos anticuerpos aparecen pocas semanas luego de el HBsAg ser detectado en la sangre, cuando el virus ya no puede ser pasado para otras personas. El aparecimiento del Anti-HBs está asociado con la recuperación y es considerado el marcador para la inmunidad. Estos anticuerpos también aparecen como resultado de una inmunización de suceso. Por lo tanto, la detección y seguimiento de anticuerpos contra el HBsAg se tornó una importante herramienta en la triagen y en el acompañamiento de los individuos infectados, bien como un indicador de suceso de los vacunados contra el VHB.

NÚMERO DE PRUEBA

Presentación 1 - 96 pruebas

Presentación 2 - 192 pruebas

Presentación 3 - 480 pruebas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frank Fenner and David O. White, Medical Virology, 4th Edition, Academic Press, 1994.
2. Centers for Disease Control. Viral Hepatitis B Fact Sheet.
3. Richman, D., R. Whitley, F. Hayden.Clinical Virology. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997.
4. World Health Organization. World Health Organization Hepatitis B Fact Sheet. N°204. Revised October 2000.
5. World Health Organization. Hepatitis B. 2002.
6. Bioclin – Datos de archivos

GARANTÍA DE CALIDAD

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



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca

CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil

Tel.: +55 (31) 3439-5454 – Fax: +55 (31) 3439-5455

E-mail: bioclin@bioclin.com.br

CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileira

ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente

Tel.: 0800 0315454

E-mail: sac@bioclin.com.br

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

Revisión: Agosto/2019

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL



NÚMERO DEL CATÁLOGO



ELABORADO POR



NÚMERO DE LOTE



CONTROL



FECHA DE FABRICACIÓN



CONTROL POSITIVO



ESTABLE HASTA
(último día del mes)



CONTROL NEGATIVO



TEMPERATURA LIMITE
(conservar a)



RIESGO BIOLÓGICO



CONTENIDO SUFICIENTE
PARA <N> TESTES



INFLAMABLE



CONSULTAR INSTRUCCIONES
DE USO



CORROSIVO



DISPOSITIVO DE
DIAGNÓSTICO IN VITRO



TÓXICO



EUROPEA REPRESENTANTE
AUTORIZADO



MARCADO CE



PROTEGER DEL
LUZ Y CALOR



NO UTILICE SI EL
EMBALAJE ESTA
DAÑADA

BIOLISA ANTI HBs

REF K121
USAGE INSTRUCTIONS

FUNCTION
Test for the quantitative detection of antibodies to surface anti-antigen of Hepatitis B virus in serum or human plasma by enzyme immunoassay, microplate. For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION
Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic
BIOLISA Anti HBs kit is a quantitative solid phase immunoassay based on the sandwich principle for the detection of Anti-HBs antibodies including IgG, IgM and IgA in serum or plasma human. The microplate is coated with recombinant HBsAg. During the test, sample and conjugate are added to the antigen coated microplate and then incubated. If the sample contains Anti-HBs antibodies, it will bind to the antigen coating the microplate, and simultaneously bind to the conjugate to form Antigen-Anti HBS-Conjugate complexes. After incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. After this step, the Substrates A and B are added and then incubated producing a blue color, indicating the amount of Anti-HBs antibodies in the sample. One Stop Solution is added to stop the reaction having a color change to yellow, measured with a microplate reader.

REAGENTS
1- Reference Standard (A - E) - Store between 2 and 8°C. Five (5) bottles (A - E) of Reference Standards containing antibodies anti virus surface antigens Hepatitis B in different concentrations in buffer solution, stabilizer and preservative. **Potentially infectious.**
Reference Standard (A - E) concentration varies with the lot. See bottle label.
2- Conjugate - Store between 2 and 8°C. Anti-human IgG antibodies linked to Peroxidase, stabilizer and preservative.
3- Sensitized Plate - Store between 2 and 8°C.
4- Concentrated Washing - Store between 2 and 8°C. Buffer solution, surfactant and preservative.
5- Substrate A - Store between 2 and 8°C. Solution containing Tetramethylbenzidine (TMB).
6- Substrate B - Store between 2 and 8°C. Solution containing Urea Peroxide.
7- Stop Solution - Store between 2 and 8°C. Sulfuric Acid 1N.
8- Plate Sealers

REAGENTS	1	2	3
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities
1- Reference Standards	1 Flask (A-E) x 1 mL	2 Flasks (A-E) x 1 mL	4 Flasks (A-E) x 1 mL
2- Conjugate	1 Flask x 8 mL	2 Flasks x 8 mL	5 Flasks x 8 mL
3- Sensitized Plate	1 Unit (96 cavities)	2 Units (96 cavities)	5 Units (96 cavities)
4- Concentrated Washing	1 Flask x 50 mL	2 Flasks x 50 mL	5 Flasks x 50 mL
5- Substrate A	1 Flask x 8 mL	2 Flasks x 8 mL	5 Flasks x 8 mL
6- Substrate B	1 Flask x 8 mL	2 Flasks x 8 mL	5 Flasks x 8 mL
7- Stop Solution	1 Flask x 12 mL	2 Flasks x 12 mL	5 Flasks x 12 mL
8- Plate Sealers	3 Units	5 Units	10 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS
Materials in the kit:
- Reagents described in the previous item
- Usage Instructions (manual)

Materials needed but not contained in the Kit:
1- Pipette(s) capable of dispensing volumes of 5, 50 and 100 µL with a lower coefficient of variation than 1,5%.
2- Re-pipettor(s) for repetitive dispensing volumes of 100 µL and 300 µL, with a lower coefficient of variation than 1,5% or multichannel pipette (optional).
3- Microplate washer (optional).
4- ELISA reader capable of absorbance at 450/630 nm wavelength.
5- Adjustable volume pipettes (200 µL to 1000 µL) for preparation of the substrate.
6- Test tubes for dilution of the substrate A and B.
7- Paper towel to dry microcavities.
8- Watch or stopwatch.
9- Container to store the Washing Solution after diluted.
10- Distilled or deionized water.
11- Tools of Quality Control.
12- Incubator of 37°C ± 2°C.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS
The storage temperature should be from 2 to 8°C. The transport can be in under ambient temperature (up to 30°C) for up to 72 (seventy two) hours. Protect from light and avoid moisture. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE
1- For professional *in vitro* diagnostic use only.
2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.
3- The envelope containing the strips should be opened only after reaching room temperature. Replace strips from unused microcavities in the aluminum bag, seal and store between 2 and 8°C.
4- The water used in material cleansing must be recent and free of contaminants.
5- Deionized saturated columns release alkaline water, several ions and oxidizing agents and reducers, that can significantly alter the results.
6- All the raw material of product is tested and should be non-reactive for Anti-HIV 1 & 2 and Anti-HCV. However, these tests do not provide total assurance of the absence of infectious agents. The manual manipulation of any product containing serum is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, we must take due care concerning biosafety while handling these products.
7- Always add reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between microcavities.
8- As a safety measure, you should cover the plate during the reaction.
9- Ensure that the bottom of the cavity is clean and dry and there are no bubbles in the liquid surface before reading the plate. Do not let the cavities run dry during the test procedure.
10- Do not expose reagents, especially the Substrate, to strong light or Hypochlorite fumes during storage or incubation steps.
11- Stop Solution contains Sulfuric Acid, which is a strong acid. Handle it with care.
12- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.
13- 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 the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.
14- Do not use the product in case of damaged packaging.
15- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES
Use serum or plasma (EDTA or Heparin). Highly lipemic or hemolyzed samples should not be used. Samples may be refrigerated at between 2 and 8°C for a maximum of 5 days. If samples can not be analyzed within 5 days, they can be stored for 30 days at -20°C (freezer).

DESCRIPTION OF PROCESS

PREPARATION OF WORKING REAGENT
Washing Solution
Dilute the contents of the Flask N° 4 (Concentrated Washing Solution) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation the solution may be stored at 2 to 30°C until expiration date printed on the original bottle. Can be stored at room temperature. If crystallization appears, heat at 37°C until dissolved.

Substrate - Working Solution
Determine the amount of cavities that are being used to prepare an appropriate volume. Prepare the solution by mixing equal parts of Substrate A and Substrate B, about 15 minutes before your use. Keep it protected from light until used
To each microcavity (test), use:
50 µL of Substrate A + 50 µL of Substrate B
For example: Mix 1 mL of Substrate A to 1 mL of Substrate B for two strips of 8 microcavities (16 tests). Leftover reagent occurs.
Use no later than one (1) hour after preparation.

TECHNIQUE
Before starting the assay, bring all Reagents, Samples and Reference Standards to stabilize at room temperature (15 - 30°C) for at least 40 minutes.
Return unused strips to the original sealed packaging.
1- Select the cavities to be used considering: Reference Standards and Samples (which may be tested in duplicate).
2- Select the first cavity for Blank (OPTIONAL).
3- Pipette 50 µL of Reference Standards (A - E) and Samples in the cavities previously determined.
4- Pipette 50 µL of Conjugate into all cavities except in the cavity Blank (if you made the choice to use Blank).
5- Mix gently for ± 30 seconds. Cover cavities with the sealer.
6- Incubate for 60 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
7- Remove the plate sealer.
8- Discard the contents of the cavities by aspiration (Washer) or by decanting (manual).
Use approximately 350 µL of Washing Solution, **previously prepared***, to perform a total of eight (8) wash cycles.
Or
Use approximately 500 µL of Wash Solution, **previously prepared***, for a total of six (6) wash cycles (exclusive to automatic equipment).
Note: Evaluate the aspiration and dispensing capacity of the equipment. To ensure the drying of the plate at the end of washing, beat it for a few seconds on absorbent paper.

9- ATTENTION Follow one of the following procedures:
A) Pipette 100 µL of **previously prepared*** Substrate - Working Solution (A+ B) in all cavities.
***See PREPARATION OF WORKING REAGENTS**
Or
B) Pipette 50 µL of Reagent A in all cavities.
Pipette 50 µL of Reagent B in all cavities.
10- Mix gently for ± 30 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
11- Incubate for 30 minutes ± 1 minute in room temperature (15 - 30°C) and protected from light.
12- Pipette 100 µL of Stop Solution in all cavities.
13- Mix gently for ± 30 seconds.
14- Reading: 450 nm (primary filter) / 630 nm (secondary filter) within 30 minutes (maximum).

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

Preparation of Calibration Curve
Record the absorbance obtained in the microplate Reader, as outlined in example 1. Calculate averages of duplicates, if carried out duplicates. Plot the absorbance of each Reference Standard versus the corresponding concentration in mUI/mL on graph paper (before you plot them on the graph). Plot the curve.

Note: The data presented in example 1 are for illustration only and may not be used in lieu the calibration curve, which must be constructed in the laboratory.

STANDARD	ABSORBANCE	AVERAGE ABSORBANCE	CONCENTRATION
A	0,026	0,027	0,0 mUI/mL
A	0,029		
B	0,101	0,102	10,0 mUI/mL
B	0,103		
C	0,660	0,665	100,0 mUI/mL
C	0,670		
D	1,700	1,734	300,0 mUI/mL
D	1,768		
E	2,214	2,217	500,0 mUI/mL
E	2,220		

Note: Samples that have absorbance above the Reference Standard must be pre-diluted and retested. The concentration must be multiplied by the dilution factor. Automatic reading and calculation can be performed through the linear regression function in an appropriate computer program.

INTERPRETATION OF RESULTS

Not Reactive: Samples with concentration lower than 10 mUI/mL are considered negative for Anti-HBs.

Reactive: Samples with concentration higher than 10 mIU/mL are considered positive for Anti-HBs.

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

Note: The data presented in the examples are for ilustration only and can be used for calculation of the results.

PROCEDURE LIMITATIONS
The interpretation of a diagnostic test, there should not be based on a single assay. Must include other confirmatory testing before a sample is considered positive. One negative result does not exclude the possibility of exposure. Finally, all results must be interpreted in conjunction with other clinical information available.

INTERNAL QUALITY CONTROL
The Clinical Laboratory must have an internal quality control, where all procedures, rules, limits and tolerance to variations be clearly established. It is important to mention that all measurement systems present a analytical variety, and it must be monitor by the laboratory. Therefore, it is recommendable the use of controls, allowing the precision and accuracy of the dosages.

PARAMETER OF QUALITY CONTROL

Absorbance of Reference Standard E (500 mUI /mL) ≥ 1,2.

PRODUCT PERFORMANCE

QUALITY CONTROL

Accuracy

COMPARISON OF METHODS AND SPECIFICITY METHODOLOGY
BIOLISA Anti HBs kit was compared with another commercially available ELISA. 07 analyzes were performed and the results were evaluated. The linear equation obtained was Y = 0,866X + 4,516 and correlation coefficient of 0,999. With these results we can conclude that the kit shows good methodological specificity.

Accuracy

REPEATABILITY

The repeatability was calculated from 20 successive determinations, using 3 samples with different concentrations, obtaining the following results:

REPEATABILITY	SAMPLE		
	1	2	3
Average	401	23	104
Standard Deviation	16,4	2,3	4,8
Coefficient of Variation (%)	4,10	10,07	4,58

REPRODUCIBILITY

The reproducibility was calculated from 20 successive determinations for 3 consecutive days, using 3 samples with different concentrations, obtaining the following results:

REPRODUCIBILITY	SAMPLE		
	1	2	3
Average	402,67	24,33	101,67
Standard Deviation	3,79	1,15	2,08
Coefficient of Variation (%)	0,94	4,75	2,05

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity is 1 mUI/mL.

Clinical Sensitivity and Specificity

BIOLISA Anti HBs kit examined clinical samples in comparison with other methods of EIA. The results show that the clinical sensitivity of BIOLISAAnti HBs kit is > 99,9% and clinical specificity of 99,4%.

	TOTAL EXPECTED	BIOLISA ANTI HBs
Negative Sample	513	510
Positive Sample	213	213

Clinical Sensitivity: > 99,9% (213/213)

Clinical Specificity: 99,4% (513/510)

Linearity

The reaction is able to detect concentrations up to the highest point of concentration on the curve. For samples with higher values dilute it, repeat the dosage and multiply the results by the dilution factor.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

The Hepatitis B virus envelope is a spherical, double-stranded DNA, from Hepadnaviridae family. Hepatitis B is transmitted through sexual contact, blood exposure, transmission from mother to child during childbirth or sharing objects cutting perforation. HBV infection has been associated with a variety of liver diseases from mild to chronic, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In some cases, the virus can persist throughout life. Annually, 1 million people die of chronic hepatitis active, cirrhosis or primary liver cancer. Hepatitis B infects millions of people worldwide and is considered a public health problem. HBsAg is one of the first markers to appear in blood after infection with Hepatitis B virus. The immune response to infection includes the development antibody specific for HBsAg. These

antibodies appear within weeks of being HBsAg detected in blood, when the virus no longer can be passed to other people. The appearance of the Anti-HBs is associated with the recovery and is considered a marker for immunity. These antibodies also appear as a result of successful immunization. Therefore, detection and monitoring antibodies against HBsAg became an important tool in screening and monitoring of infected individuals, as well as an indicator of success of those vaccinated against HBV.

NUMBER OF TESTS

Presentation 1 - 96 tests

Presentation 2 - 192 tests

Presentation 3 - 480 tests

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Frank Fenner and David O. White, Medical Virology, 4th Edition, Academic Press, 1994.
2. Centers for Disease Control. Viral Hepatitis B Fact Sheet.
3. Richman, D., R. Whitley, F. Hayden. Clinical Virology. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997.
4. World Health Organization. World Health Organization Hepatitis B Fact Sheet. N°204. Revised October 2000.
5. World Health Organization. Hepatitis B. 2002.
6. Bioclin – Dados de arquivos

QUALITY ASSURANCE

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

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Phone: +55 (31) 3439.5454 - Fax: +55 (31) 3439.5455
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

ANVISA registration for BIOLISA Anti HBs kit: 10269360289

Review: August/2019

UNIVERSAL SYMBOLOGY



CATALOG NUMBER



MANUFACTURED BY



BATCH CODE



CONTROL



DATE OF MANUFACTURE



POSITIVE CONTROL



USED BY
(last day of month)



NEGATIVE CONTROL



TEMPERATURE LIMITATION
(store at)



BIOLOGICAL RISK



CONTAINS SUFFICIENT
FOR <N> TESTS



INFLAMMABLE



CONSULT INSTRUCTIONS
FOR USE



CORROSIVE



IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE



POISON



EUROPEAN AUTHORIZED
REPRESENTATIVE



CE MARK



KEEP AWAY
FROM SUNLIGHT



DO NOT USE IF
PACKAGE IS
DAMAGED