

BIOLISA ANTI HBs

K 121

INSTRUÇÕES 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 enzimaímmunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaímmunoensaio ou imunoenzimétrica.

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, as amostras são adicionadas à microplaca revestida com antígeno e então incubadas. Se a amostra contiver anticorpos Anti-HBs, este se ligará ao antígeno que reveste a microplaca. Após a lavagem, adiciona-se o conjugado Anti Anti-HBs que formará um complexo 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 - D)

Quatro (4) frascos (A - D) de Padrões de Referência contendo anticorpos anti - antígenos de superfície de vírus da Hepatite B em diferentes concentrações em solução de tampão e conservante. Estocar entre 2 e 8°C.

A- 0,0 mUI/mL
B- 10,0 mUI/mL
C- 100,0 mUI/mL
D- 500,0 mUI/mL

2-Conjugado

Anticorpo anti-IgG humano ligado a peroxidase; conservante. Estocar entre 2 e 8°C.

3-Placa Sensibilizada.

Estocar entre 2 e 8° C

4-Lavagem Concentrada (50x)

Solução tampão, surfactante e conservante.

5-Substrato A

Tampão contendo peróxido de hidrogênio; conservante. Estocar entre 2 e 8°C.

6-Substrato B

Tampão contendo tetrametilbenzidina (TMB); conservante. Estocar entre 2 e 8°C.

7-Solução de Parada

Ácido clorídrico 1M. Estocar entre 2 e 8°C.

8-Seladores de Placa

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Padrões Referência	1 Frasco (A - D) X 1 mL	2 Frascos (A - D) X 1 mL	4 Frascos (A - D) X 1 mL
2- Conjugado	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
3- Placa sensibilizada acondicionada em embalagem de alumínio, com sílica (anti - Umidade)	1 Unidade (96 cavidades)	2 Unidades (96 cavidades)	5 Unidades (96 cavidades)
4- Lavagem Concentrada	1 Frasco X 20 mL	2 Frascos X 20 mL	5 Frascos X 20 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 8 mL	2 Frascos X 8 mL	4 Frascos X 8 mL
8- Seladores de Placas	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 100µl com precisão maior que 1,5%.
- 2- Repetidores para pipetagens repetitivas de volumes de 100µl e 300µl , com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 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 (200µl a 1000µl) 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 em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas.

Não congelar. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 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 estocar a 2-8°C;
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;

5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, ions diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;

6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente;

7 - 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;

8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades;

9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina;

10 - 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 armazenamento ou etapas de incubação.

12-A Solução de Parada contém ácido clorídrico, que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com o devido cuidado.

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). Para amostras que serão testadas em duplicata, o volume requerido é de 0,010 mL de soro.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de Lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco n° 4 (Lavagem Concentrada) em 1000mL de água destilada ou deionizada.

Estocar entre 2 e 8° C até a data de validade impressa no frasco original.

Pode ser armazenada em temperatura ambiente.

Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 ° até dissolução.

2) 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 1mL de Substrato A e 1mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes). Ocorre sobra de reagente

TÉCNICA

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os Reagentes, Amostras, Padrões de Referência e Controles 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, Controles e Amostras (podendo ser testados em duplicata);

2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL);

3- Pipetar 50µL dos Padrões Referência (A - D), e amostras nas cavidades determinadas;

4- Pipetar 50µL de Conjugado em cada cavidade 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 300µL aproximadamente de Lavagem Concentrada previamente preparada*, para 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- ATENÇÃO SIGA um dos seguintes procedimentos:

A) Pipetar 100µL de Substrato previamente preparado* – Solução de Trabalho (A + B) em cada cavidade.
*(Vide preparo de reagentes)

OU

B) Pipetar 50µL de Substrato A em cada cavidade.
Pipetar 50 µL de Substrato B em cada cavidade.

10- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

11- Incubar por 30 minutos ± 1 minuto em temperatura ambiente (15 – 30°C)

12- Pipetar 50µL de Solução de Parada em cada cavidade.

13- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

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

DESCRIÇÃO DOS CALCULOS

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 de 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	Absorb	Abs. Média	concentração
A	0,026	0,027	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	2,214	2,217	500,0 mUI / mL
D	2,220		

NOTA: As amostras que tenham absorbância acima do Padrão de 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. Se a nova amostra for positiva, a amostra deve ser considerada positiva.

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

Cada laboratório deve estabelecer valores de referência para os controles em níveis baixo, normal e elevado para monitorar a performance do teste.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O kit BIOLISA Anti HBs foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente. Foram utilizadas 07 amostras de soro humano. A equação da reta de regressão linear obtida foi $y = 0,9992x + 0,4894$ e o coeficiente de correlação 0,9998. Com estes resultados pode-se concluir que os kits apresentam boa especificidade metodológica.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade indica o limite de detecção do método. Foi calculada a partir de vinte (20) determinações de Anti-HBs, em uma amostra isenta desses analitos. Foi encontrado um valor médio igual a 0,97 mUI/mL, com desvio padrão de 0,02 mUI/mL.

A sensibilidade, que corresponde a soma da média encontrada com 3 vezes o desvio padrão, para este método, é igual a 1,02 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 99,3%, e a especificidade clínica é de 99,1%.

BIOLISA ANTI HBs X EIA REFERÊNCIA

MÉTODO		EIA REFERÊNCIA		TOTAL
BIOLISA ANTI HBs	RESULTADO	POSITIVO	NEGATIVO	
	POSITIVO	883	15	898
	NEGATIVO	6	1661	1667
RESULTADO TOTAL		889	1676	2565

Sensibilidade Clínica: 99,3% (98,5 - 99,8%)*
Concordância global: 99,2% (98,8 - 99,5)*
Especificidade Clínica: 99,1% (98,5 - 99,5%)*
95% Intervalo de confiança*

Precisão

REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Repetibilidade		
	1	2	3
Média	1,849	26,716	137,406
Desvio padrão	0,036	0,295	0,387
Coefficiente de variação (%)	1,957	1,104	0,281

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens durante 3 dias consecutivos com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Reprodutibilidade		
	1	2	3
Média	1,844	26,691	137,514
Desvio padrão	0,006	0,030	0,094
Coefficiente de variação (%)	0,302	0,112	0,068

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 CLÍNICO

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

BIBLIOGRAFIA

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.

DADOS DO FABRICANTE

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:
10269360198

Revisão: Fevereiro/12