

Bioclin

BIOLISA HBsAg

K 120

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

O Kit BIOLISA HBsAg é um teste de terceira geração para a detecção qualitativa da presença do antígeno de superfície de Hepatite B no soro ou plasma humano. O teste utiliza anticorpos monoclonais para detectar vários subtipos do HBsAg no soro ou plasma.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrica.

O Kit BIOLISA HBsAg é um ensaio imunoenzimático em fase sólida com base no princípio "sanduíche" para a detecção do HBsAg no soro ou plasma humano. A microplaca é revestida com anticorpos monoclonais específicos para vários subtipos do HBsAg. Durante o teste, amostra e enzima - conjugado anticorpo HBsAg são adicionadas à microplaca revestida com anticorpo e então incubadas. Se a amostra contiver HBsAg, este se ligará aos anticorpos que revestem a microplaca e, simultaneamente, se ligarão ao conjugado imobilizado para formar complexos Anticorpo-HBsAg-Conjugado. Após a incubação a microplaca é lavada para remoção dos materiais não ligados.

Após esta etapa, os Substratos A e B são adicionados e incubados, produzindo uma cor azul que indica a quantidade de antígeno de Hepatite B presentes nas amostras. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

REAGENTES

1. Placa Sensibilizada

Microplaca revestida com anticorpos anti - HBsAg

2. Conjugado

Anticorpos Anti - HBsAg ligados à peroxidase; conservante.

3. Lavagem Concentrada (50x)

Solução tampão, surfactante e conservante.

4. Substrato A

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

5. Substrato B

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

6. Solução de Parada

Ácido Clorídrico 1M. Estocar entre 2 e 8° C;

7. Controle Negativo

Solução não reativa para HBsAg, HCV, HIV-1 e HIV-2; conservante;

8. Controle Positivo

Solução contendo HBsAg e negativo para HCV, HIV-1 e HIV-2 ; conservante;

9. Seladores de Placa

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa sensibilizada	1 Unidade (96 cavidades)	2 Unidades (96 cavidades)	5 Unidades (96 cavidades)
2- Conjugado	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco X 20 mL	2 Frascos X 20 mL	4 Frascos X 20 mL
4- Substrato A	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
5- Substrato B	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
6- Solução de Parada	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
7- Controle Negativo	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
8- Controle Positivo	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
9- Seladores de Placa	3 unidades	5 unidades	10 unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, não contidos nos Kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5, 50 e 100µL com precisão maior que 1,5%.
- 2- Repipetadores para pipetagens repetitivas de volumes de 100 µL e 300 µL, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 e 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, íons 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 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 à 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° 3 (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°C 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 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 microcavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras. (podendo ser testados em duplicata).

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

3- Pipetar nas cavidades correspondentes 100µL de Controle Negativo, Controle Positivo e Amostras.

4- Pipetar 50µL de Conjugado em cada cavidade exceto na cavidade do branco.

5- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o Selador de placa.

6- ATENÇÃO SIGA um dos seguintes procedimentos:

A) Padrão:

Incubar por 60 minutos ± 2 minutos a 37° C ± 2° C.

OU

B) Avançado:

Incubar por 120 minutos ± 2 minutos 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 Solução de Lavagem previamente preparada*, para 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 DOS REAGENTES DE TRABALHO

OU

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

Pipetar 50µL de Substrato B em todas as cavidades.

10- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

11- ATENÇÃO SIGA um dos seguintes procedimentos:

A) Padrão:

Incubar por 10 minutos ± 1 minuto a 37°C ± 2°C.

OU

B) Avançado:

Incubar por 30 minutos ± 2 minutos a 37°C ± 2°C.

12- Retirar o selador de placa das cavidades;

13- Pipetar 50µL de Solução de Parada em cada cavidade;

14- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos;

15- Ler a 450nm (filtro primário) / 630nm (filtro secundário) até 30 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura dos controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	Requisitos de Validação
Cavidade Branco	<0,050
Controle Negativo	<0,100
Controle Positivo	>1,000

As absorvâncias para os controles acima foram obtidas após a diminuição da absorvância do branco. Para leitura em filtro único (450 nm) considerar limite de branco < 0,100.

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

DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

QUALITATIVO

Calcular a absorbância média do Controle Negativo.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Controle Negativo	A1= 0,023
	A2= 0,021
Absorbância média do Controle Negativo	$(0,023 + 0,021) / 2 = 0,022$

Se os Resultados dos Controles Forem Válidos, **calcule** o Cut-Off com a seguinte fórmula.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
CUT-OFF = Absorbância média do Controle Negativo + 0,070	$0,022 + 0,070 = 0,092$

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

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Amostra	0,900
Valor de Cut-Off	0,092
Índice: Amostra / Valor de Cut-Off	$0,900 / 0,092 = 9,78$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADOS	QUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	$\geq 0,9$ e $\leq 1,1$

NÃO REATIVA: * Amostra com absorbância menor que o CUT-Off é considerada não reativa para antígeno da hepatite B e pode ser considerada negativa.

REATIVA: * Amostra com absorbância superior ao CUT-Off é considerada inicialmente reativa para antígeno da hepatite B. A amostra deve ser reanalisada em duplicata antes do final da interpretação. A amostra que for reativa em pelo menos uma das reanálises, se presume ser reativa, e deve ser confirmada através de método confirmatório.

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

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do Kit BIOLISA HBsAg foi determinada utilizando controles HBsAg de subtipos Ad+ Ay. A sensibilidade analítica é de 0,2 UI/mL utilizando o procedimento padrão e de 0,1 UI/mL, utilizando o procedimento avançado, e que foram todos confirmados usando o padrão internacional da WHO NISBC com o número de código 01/476-011-WIL para HBsAg.

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O Kit BIOLISA HBsAg analisou amostras clínicas (soro-conversão) em comparação com outro método de EIA. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do Kit BIOLISA HBsAg é >99,9%, e a especificidade clínica é de 99,9%.

MÉTODO	EIA REFERÊNCIA		TOTAL	
	POSITIVO	NEGATIVO		
BIOLISA HBsAg	RESULTADO			
	POSITIVO	562	3	565
	NEGATIVO	0	5234	5234
RESULTADO TOTAL	562	5237	5799	

Sensibilidade Clínica: >99,9% (99,4 – 100,0%) *

Concordância global: 99,9% (99,9 – 100,0) *

Especificidade Clínica: 99,9% (99,8 - 100,0%) *

*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	0,677	1,350	2,720
Desvio padrão	0,072	0,082	0,074
Coefficiente de variação (%)	10,663	6,075	2,715

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com 3 amostras, durante 3 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Reprodutibilidade		
	1	2	3
Média	0,685	1,355	2,726
Desvio padrão	0,007	0,021	0,009
Coefficiente de variação (%)	1,056	1,579	0,339

SIGNIFICADO CLÍNICO

HBsAg é um dos primeiros marcadores que aparecem no sangue após a infecção com o vírus da hepatite B (HBV). Esta infecção do fígado é transmitida através do contato sexual, exposição pelo sangue, pela transmissão de mãe para filho durante o parto ou compartilhamento de objetos perfuro cortantes. Os principais subtipos de HBsAg inclui ad e Ay, todos compartilhando o determinante comum 'a'. A infecção pelo HBV provoca uma grande variedade de danos no fígado, como infecção aguda auto-limitante, hepatite fulminante, hepatite crônica com progressão para cirrose e insuficiência hepática, e estado de portador crônico assintomáticos. O vírus HBV em pessoas infectadas, persiste para o resto de suas vidas e pode ser transmitido para outras pessoas. Assim, a hepatite B se tornou um problema de saúde pública. A infecção pelo HBV resulta em um número aparente de marcadores sorológicos e um dos primeiros desses marcadores é o Antígeno de Superfície de Hepatite B (HBsAg). O HBsAg aparece de 1 - 10 semanas após a exposição e antes das evidências bioquímicas da doença hepática ou icterícia. Três semanas após o início da hepatite aguda quase metade dos pacientes ainda será positivo para o HBsAg. No estado de portador crônico, o HBsAg persiste por 6 - 12 meses, sem soro-conversão para os anticorpos correspondentes. Portanto, a triagem para HBsAg é altamente recomendada para todos os doadores, as mulheres grávidas e pessoas em grupos de alto risco.

NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 – 96 testes

Apresentação 2 – 192 testes

Apresentação 3 – 480 testes

BIBLIOGRAFIA

1. Blumberg, B.S. The Discovery of Australian Antigen and its Relation to Viral Hepatitis. *Vitro*. 1971;7:223.
2. Krugman, S. Glies J.P. Viral Hepatitis, Type B (MS-2-Strain). Further Observations on Natural History and Prevention. *New England Journal of Medicine*. 288, 755.
3. Krugman, S. Overby L.R., et al. Viral Hepatitis Type B Studies On Natural History and Prevention Re-examined. *New England Journal of Medicine*. 300, 101.
4. 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 HBsAg na ANVISA: 10269360197

Revisão: Junho/2011