

# Bioclin

## BIOLISA HCV

### K 128

#### INSTRUÇÕES DE USO

##### FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos IgG para Vírus da Hepatite C (HCV) em soro ou plasma humano, por ensaio imunoenzimático, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

##### PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrica.

O Kit BIOLISA HCV é um ensaio imunoenzimático indireto em fase sólida baseado na detecção qualitativa de anticorpos IgG para HCV em soro ou plasma humano. A microplaca é revestida com antígenos HCV recombinante da região do Core, NS3, NS4 e NS5. Durante os testes, o Diluente de Amostra e as Amostras são adicionados na microplaca revestida com antígeno e depois incubados. Se as amostras contiverem anticorpos contra o HCV, estes se ligarão aos antígenos que revestem a microplaca para formar complexos antígeno - anticorpo HCV imobilizados. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O Anticorpo anti- IgG humano conjugado à peroxidase é adicionado à microplaca, que é então incubada. O Anticorpo anti- IgG humano conjugado à peroxidase liga-se aos complexos imobilizados. Após a segunda incubação, a microplaca é lavada para remoção dos materiais não ligados. Após esta etapa, o Substrato A e Substrato B são adicionados e, em seguida, incubados para produzir uma cor azul, que indica a quantidade de anticorpos HCV presente na amostra. Uma solução de Ácido clorídrico é adicionada à microplaca para interromper a reação produzindo uma alteração de cor de azul para amarelo. A intensidade da cor, que corresponde à quantidade de anticorpos HCV presente na amostra, é medida com um leitor de microplacas.

##### REAGENTES

###### 1. Placa Sensibilizada

Microplaca revestida com antígenos recombinante HCV.

###### 2. Conjugado

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

###### 3. Lavagem Concentrada (50x)

Solução tampão; Surfactante; conservante.

###### 4. Diluente de Amostra

Solução tampão; Conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

###### 5. Substrato A

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

###### 6. Substrato B

Solução 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. Controle Negativo

Solução não reativa para HCV, HBsAg, HIV-1 and HIV-2; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

###### 9. Controle Positivo

Solução contendo anticorpos para HCV e negativa para HBsAg, HIV-1 e HIV-2 ; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

###### 10. Seladores de Placa

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 12 mL	2 Frascos X 12 mL	5 Frascos X 12 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco X 20 mL	2 Frascos X 20 mL	4 Frascos X 20 mL
4- Diluente de Amostra	1 Frasco X 12 mL	2 Frascos X 12 mL	4 Frascos X 12 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	5 Frascos X 8 mL
8- Controle Negativo	1 Frasco X 0,4 mL	2 Frascos X 0,4 mL	5 Frascos X 0,4 mL
9- Controle Positivo	1 Frasco X 0,4 mL	2 Frascos X 0,4 mL	5 Frascos X 0,4 mL
10- Seladores de Placa	3 unidades	5 unidades	8 unidades

##### APRESENTAÇÃO

##### EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

###### Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.

- Instruções de uso (manual).

###### Materiais necessários, mas não contidos nos Kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 10, 50 e 100µL com precisão maior que 1,5%;
- 2- Repipetadores 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 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 HBsAg e Anti-HIV 1 & 2. 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 procedimento;
- 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 hemolizadas 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 0,010mL de soro.

##### DESCRIÇÃO DO PROCESSO

##### PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

###### 1) Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco nº 3 (Lavagem Concentrada) em 1200mL 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 não utilizadas para a embalagem original selada.

- 1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles, Amostras e o Branco (se houver), podendo ser testados em duplicata.
  - 2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
  - 3- Pipetar 100µL de Diluente de Amostra nas respectivas cavidades: Controle Negativo, Controle Positivo e Amostras. (inclusive branco)
  - 4- Pipetar 10µL de Controle Negativo, Controle Positivo e Amostra nas cavidades selecionadas.
  - 5- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
- \*Ocorre mudança de cor de verde para azul nas cavidades das amostras.  
Cobrir as cavidades com o selador de placa.

6- Incubar por 30 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 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- Pipetar 100µL de Conjugado em cada cavidade exceto na cavidade do branco (caso tenha feito a opção).

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-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 e 50µL de Substrato B em todas as cavidades.

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 50µL de Solução de Parada em cada cavidade.

19- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

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

##### VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura dos Padrões de Referência estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	Absorvância média
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

Para Cálculo do Cut-off, calcular a absorbância média do Controle Negativo.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Controle Negativo	A1= 0,014
	A2= 0,012
Absorbância média do Controle Negativo	$(0,014 + 0,012) / 2 = 0,013$

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 + 0,145	$0,013 + 0,145 = 0,158$

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

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Amostra	1,100
Valor de Cut-Off	0,158
Índice: Amostra / Valor de Cut-Off	$1,100 / 0,158 = 6,96$

### 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 ou igual ao CUT-Off é considerada não reativa para anticorpos da hepatite C e pode ser considerada negativa.

**REATIVA:** \* Amostra com absorbância maior que o CUT-Off é considerada reativa para anticorpos da hepatite C e pode ser considerada positiva, e deve ser confirmada usando testes de confirmação.

**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 e Especificidade Clínica

O Kit Biolisa HCV analisou amostras clínicas (soro conversão) em comparação com outro método de EIA. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do Kit Biolisa HCV é > 99,9%, e a especificidade clínica é de 99,8%.

#### HCV EIA x EIA REFERÊNCIA

MÉTODO	EIA REFERÊNCIA		TOTAL	
	POSITIVO	NEGATIVO		
BIOLISA HCV	POSITIVO	297	10	307
	NEGATIVO	0	5897	5897
RESULTADO TOTAL	297	5907	6204	

Sensibilidade Clínica: >99,9% (97,0 – 100,0%) \*

Concordância global: 99,8% (99,6 – 100,0) \* Especificidade Clínica: 99,8% (99,5- 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	0,768	1,696	3,432
Desvio padrão	0,030	0,063	0,112
Coefficiente de variação (%)	3,954	3,737	3,262

#### REPRODUTIBILIDADE

O ensaio de precisão foi determinado dosando, 20 vezes, 3 amostras diferentes, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados.

Amostra	Reprodutibilidade		
	1	2	3
Média	0,761	1,713	3,411
Desvio padrão	0,007	0,015	0,022
Coefficiente de variação (%)	0,862	0,864	0,648

#### SIGNIFICADO CLÍNICO

O vírus da Hepatite C possui um pequeno envelope e é a principal causa da transmissão parenteral de hepatite não-A e não-B. A infecção por HCV provoca uma grande variedade de doença hepática crônica, cirrose e câncer hepático. A principal via de transmissão do vírus é através de transfusão de sangue e hemoderivados, transplante de órgãos, e compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas. Anticorpos contra o HCV são encontrados em mais de 80% dos pacientes com hepatite não-A e não-B. Clonagem do genoma viral tornou possível o desenvolvimento de testes sorológicos que utilizam antígenos recombinantes.

O kit Biolisa HCV é um imunoenensaio de terceira geração para a detecção qualitativa da presença de anticorpos anti-HCV IgG em soro ou plasma. O teste utiliza antígenos recombinantes de HCV codificado pelos genes estruturais para ambos (nucleocapsídeo) e proteínas não-estruturais para detectar seletivamente anticorpos contra o HCV em soro ou plasma.

#### NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 – 96 testes

Apresentação 2 – 192 testes

Apresentação 3 – 480 testes

#### BIBLIOGRAFIA

- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. Science. 1989;244:359.
- Kuo, G., Q.L. Choo, H.J. Alter, and M. Houghton. An Assay for Circulating Antibodies to a Major Etiologic Virus of Human Non-A, Non-B Hepatitis. Science. 1989;244:362.
- Van der Poel, C. L., H.T.M. Cuyper, H.W. Reesink, and P.N.Lelie. Confirmation of Hepatitis C Virus Infection by New Four-antigen Recombinant Immunoblot Assay. Lancet. 1991;337:317.
- Wilber, J.C. Development and Use of Laboratory Tests for Hepatitis C Infection: A Review. J. Clinical Immunology. 1993;16:204.
- Biolin – Dados de arquivos

#### GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Biolin** 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 HCV na ANVISA: 10269360205

Revisão: Junho/2011