



# Hepatitis B (anti-HBc)

*ELISA*

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos contra el antígeno core del virus de la hepatitis B (anti-HBc)

## SIGNIFICACION CLINICA

La hepatitis B es una enfermedad viral caracterizada por un período prolongado de incubación (45-160 días). El virus causante de esta patología (HBV) es una partícula compuesta por una región interior o "core" donde se encuentra el DNA y una envoltura exterior antigénica conocida como antígeno de superficie (HBsAg). Su presencia en suero indica enfermedad activa.

El antígeno "core" (HBcAg) normalmente no se detecta en suero, pero su anticuerpo (anti-HBc) se presenta entre los 10 y 25 días posteriores a la aparición del HBsAg, persistiendo aún después de la desaparición de este último antígeno y antes de la aparición de su anticuerpo (anti-HBs). Por lo tanto en ausencia de HBsAg y anti-HBs, anti-HBc es el único marcador serológico de infección reciente por el virus de la hepatitis B. Por otra parte, dado que este anticuerpo permanece detectable en suero por largo tiempo luego de la infección, puede detectar una infección pasada.

## FUNDAMENTOS DEL METODO

La muestra se pone en contacto con el antígeno HBcAg inmovilizado sobre el soporte sólido en presencia de anticuerpo anti-HBc conjugado con peroxidasa. Si la muestra contiene anticuerpos específicos, éstos competirán con el conjugado por el antígeno presente en el soporte.

Luego de incubar y lavar para eliminar la fracción no unida, se agrega el sustrato enzimático.

A mayor cantidad de anti-HBc presente en la muestra, menor será el desarrollo de color.

## REACTIVOS PROVISTOS

**Policubeta sensibilizada:** policubeta de tiras removibles con pocillos que contienen HBcAg recombinante inmovilizado.

**Conjugado:** anticuerpo anti-HBc conjugado con peroxidasa.

**Revelador A:** peróxido de hidrógeno 60 mmol/l en buffer citrato 50 mmol/l pH 3,2.

**Revelador B:** tetrametilbencidina (TMB) 0,01 mol/l en ácido clorhídrico 0,1 N.

**Stopper:** ácido sulfúrico 2 N.

**Buffer de Lavado concentrado:** cloruro de sodio 1,4 mol/l en buffer fosfatos 100 mmol/l y tensioactivo no iónico 0,1 g/l.

**Control Positivo:** dilución de suero reactivo para anticuerpos anti-HBc, inactivado.

**Control Negativo:** dilución de suero no reactivo, inactivado.

## INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Buffer de Lavado:** a baja temperatura los componentes del reactivo pueden precipitar. En tal caso, antes de diluir, colocar

en baño de agua a 37°C unos minutos, mezclando luego por inversión. Para usar diluir 1+4 con agua destilada (1 parte de Buffer de Lavado concentrado + 4 partes de agua destilada).

**Policubeta sensibilizada:** lista para usar.

**Conjugado:** listo para usar.

**Revelador A:** listo para usar.

**Revelador B:** listo para usar.

**Stopper:** listo para usar.

**Control Positivo y Control Negativo:** listos para usar.

## PRECAUCIONES

- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Los controles se encuentran inactivados. Sin embargo, deben emplearse como si se tratara de material infeccioso.
- Los sueros controles han sido examinados para HIV encontrándose negativos.
- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. No usar baño de agua. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos entren en contacto con la policubeta, ya que el hipoclorito afecta la reacción.
- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Evitar contacto del ácido sulfúrico (Stopper) con piel y mucosas. R36/38: irrita los ojos y la piel. R34: provoca quemaduras. S24/25: evítense el contacto con los ojos y la piel. S26: en caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S28: en caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
- Evitar el derrame de líquidos y formación de aerosoles.

## ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

**Buffer de Lavado:** estable 3 meses a temperatura ambiente.

**Policubeta sensibilizada:** las tiras de pocillos con antígeno inmovilizado se proveen cerradas al vacío y con desecante. No abrir el envoltorio hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente, de lo contrario se favorecerá la humectación del contenido. Las tiras de pocillos no utilizadas deben conservarse dentro del sobre con el desecante, cerrado y a 2-10°C. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 5 meses posteriores mientras no se supere la fecha de vencimiento del equipo.

#### MUESTRA

Suero o plasma

- a) Recolección:** obtener la muestra de la manera usual.
- b) Aditivos:** si se emplea plasma puede utilizarse cualquier anticoagulante de uso corriente en la práctica transfusional.
- c) Sustancias interferentes conocidas:** la hemólisis, hiperlipemia y otras causas de turbiedad pueden provocar resultados erróneos. Estas muestras deben ser clarificadas por centrifugación.
- d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** las muestras pueden conservarse durante 7 días a 2-10°C. Para conservación por períodos más prolongados deben ser congeladas a -20°C o menos. Evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados. Existen evidencias que muestran que los congelamientos sucesivos pueden ser causa de resultados erróneos.
- Si las muestras deben ser transportadas, embalar de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de materiales infecciosos.

#### MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas capaces de medir los volúmenes indicados
- Reloj alarma o cronómetro.
- Estufa a 37°C.
- Material volumétrico adecuado.
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas.

#### CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 450 nm
- Longitud de onda secundaria (bicromática): 620-650 nm
- Calibración del instrumental: llevar a cero el espectrofotómetro con Blanco de Reactivos procesándolo de la misma forma que una determinación pero omitiendo colocar Muestra y Conjugado, es decir, sólo Revelador A, Revelador B y Stopper.
- Volumen de muestra: 100 ul
- Tiempo de reacción: 2 horas 30 minutos
- Temperatura de reacción: 37°C y temperatura ambiente.

#### PROCEDIMIENTO

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba. Una vez iniciado el procedimiento debe completarse sin interrupción. Procesar simultáneamente 2 Controles Positivos (CP), 3 Negativos (CN) y los Desconocidos (D). En los pocillos a

utilizar de la policubeta colocar:

	D	CP	CN
<b>Muestra</b>	100 ul	-	-
<b>Control Positivo</b>	-	100 ul	-
<b>Control Negativo</b>	-	-	100 ul
<b>Conjugado</b>	1 gota	1 gota	1 gota

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 60 ul.

Debido a la alta densidad del Conjugado es importante mezclar homogeneizando perfectamente mediante suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos.

Para evitar la evaporación, cubrir la placa con una cinta autoadhesiva e incubar 2 horas en estufa a 37°C. Luego aspirar cuidadosamente el líquido de cada pocillo recibiendo en un recipiente para desechos biológicos que contenga 5% de hipoclorito sódico. A continuación, lavar 5 veces con Buffer de Lavado empleando aproximadamente 300 ul/vez/pocillo. Después de cada lavado, el líquido se descartará también en el recipiente con hipoclorito. Opcionalmente, emplear lavador automático. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pocillos. Luego agregar en cada pocillo:

<b>Revelador A</b>	1 gota	1 gota	1 gota
<b>Revelador B</b>	1 gota	1 gota	1 gota

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul.

Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos.

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y luego agregar:

<b>Stopper</b>	1 gota	1 gota	1 gota
----------------	--------	--------	--------

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul.

Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos.

Leer en espectrofotómetro a 450 nm o bicromática a 450/620-650 nm o evaluar el resultado a simple vista por comparación con los Controles Positivos y Negativos.

#### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 30 minutos por lo que los resultados deben observarse dentro de ese lapso.

#### CRITERIOS DE VALIDACION DE LA CORRIDA

La corrida se considera válida si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

a) La lectura media de los Controles Negativos, corregida contra el Blanco de Reactivos, debe ser mayor o igual a 0,600 D.O.

b) La lectura media de los Controles Positivos, corregida contra el Blanco de Reactivos, debe ser menor o igual a 0,200 D.O.

Si alguna de estas condiciones no se cumple, repetir la corrida. Recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

### INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La reactividad de la muestra se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor cut-off.

Cut-off = 0,4 CN + 0,6 CP

donde:

CN: promedio de las lecturas de los Controles Negativos.

CP: promedio de las lecturas de los Controles Positivos.

**Muestras Reactivas:** se consideran aquellas con absorbancias menores o iguales al valor cut-off. Estas muestras deben ser ensayadas nuevamente.

**Muestras no Reactivas:** se consideran aquellas con absorbancias mayores al valor cut-off.

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Constituyen causas de resultados erróneos:

- Lavado incorrecto de los pocillos de reacción.
- Contaminación cruzada de Muestras no Reactivas con anticuerpos procedentes de una Muestra Reactiva.
- Contaminación de la solución cromogénica con agentes oxidantes (cloro, etc.)
- Contaminación del Stopper.
- Falta de homogeneización de las muestras con el Conjugado.
- Conservación inadecuada de las tiras de pocillos no utilizadas.
- Contaminación del Buffer de Lavado diluido. Se recomienda verificar la limpieza de los recipientes donde se prepara y almacena. Si se observa aparición de turbidez o precipitado al prepararlo, debe desecharse.

No utilizar baño de agua para la incubación.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por HBV.

Ocasionalmente, al efectuar lecturas bicromáticas, pueden obtenerse absorbancias negativas que no invalidan la determinación. Esto se debe a que algunas muestras dan lecturas inferiores al Blanco de Reactivos.

Verifique que el sistema lavador que Ud. está usando (WIENER WASHER u otro), aspire totalmente el contenido de los pocillos y que el volumen de la solución lavadora sea pareja.

### PERFORMANCE

**a) Sensibilidad:** la sensibilidad basada en la prevalencia asumida del 100% de anticuerpos anti-HBc en individuos con hepatitis B, se estima en 98,7%.

**b) Especificidad:** la especificidad basada en la prevalencia asumida del 0% de anticuerpos anti-HBc en individuos sanos, se estima en 99,4%.

**c) Estudio poblacional:** en una población general que incluye individuos sanos, donantes, con hepatitis B y otras patologías, la correlación con respecto a métodos de referencia, fue del 98,7%.

### PRESENTACION

Kit para 96 determinaciones (Cód. 1483255) conteniendo:

- 1 Policubeta sensibilizada
- 1 x 9 ml Conjugado
- 1 x 9 ml Revelador A
- 1 x 9 ml Revelador B
- 1 x 9 ml Stopper
- 1 x 240 ml Buffer de Lavado concentrado
- 1 x 2 ml Control Positivo
- 1 x 2,5 ml Control Negativo

### BIBLIOGRAFIA

- Wisdon, G.B. - Clin. Chem. 22/8:1243, 1976.
- Engvall, E. - Methods Enzymol. 70:419, 1980.
- Gerety, R.J. - "Hepatitis B" - Academic Press, Inc., USA, 1985.
- Chang, Y. - Diagnostic Medicine 6/5:28, 1983.
- Argeri, N. et al. - Qualitas 1/2:118, 1982.
- Katchaki; J. et al. - Vox Sang. 37:9, 1979.
- García Solís - Análisis Clínicos 24/6:199, 1988.

## EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

**Policubeta** | **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

**Buf. Lavado** | **Conc.**

Buffer de Lavado Concentrado

**Conjugado**

Conjugado

**Stopper**

Stopper

**Revelador** | **A**

Revelador A

**Revelador** | **B**

Revelador B

**Control** | **+**

Control Positivo

**Control** | **-**

Control Negativo

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

**EC** | **REP** Representante autorizado en la Comunidad Europea

**IVD** Uso diagnóstico "in vitro"

Contenido suficiente para <n> ensayos

Fecha de caducidad

Límite de temperatura (conservar a)

No congelar

Riesgo biológico

Volumen después de la reconstitución

**Cont.** Contenido

**LOT** Número de lote

Elaborado por:

**Xn**  
 Nocivo

Corrosivo / Caústico

**XI**  
 Irritante

Consultar instrucciones de uso

**Calibr.** |  Calibrador

**CONTROL** |  Control

**CONTROL** | **+** |  Control Positivo

**CONTROL** | **-** |  Control Negativo

**REF** |  Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
Cert. N°: 216/93



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina