

HBcAb

Anticuerpos Contra el Virus de la Hepatitis Tipo B Core (Elisa)

Uso:

Inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos contra el antígeno Core del virus de la hepatitis B en suero/plasma humano

Resumen:

Como parte de la familia Hepadnaviridae, el VHB es un virus de ADN de doble cadena envuelto que es la principal causa de transmisión de la hepatitis a través de la sangre. Los efectos de la infección por VHB varían desde hepatitis leve a grave, que incluye problemas hepáticos crónicos, como carcinoma y cirrosis. Para clasificar la infección por hepatitis B, es necesario identificar los marcadores serológicos durante las tres fases de la infección: incubación, aguda y convalescente. El componente principal del virus es el antígeno central de la hepatitis B (HBcAg). Este antígeno central está compuesto por un único polipéptido de aproximadamente 17 kD que se descarga tras la desagregación de las partículas centrales. Al menos un determinante inmunológico está presente en el antígeno. Poco después de la aparición de HBsAg, aparecen anticuerpos contra HBcAg (anticuerpo total anti-HBc e IgM) y nunca desaparecen. En casos aislados, se puede contraer una infección por hepatitis B sin anti-HBc inmunológicamente detectable. Esto se encuentra generalmente en pacientes inmunosuprimidos. La detección de anti-HBc arroja datos sobre la prevalencia de la hepatitis B en varias poblaciones. Esto se debe a que el anti-HBc es un marcador de infección por VHB aguda, crónica o resuelta. La identificación de anti-HBc es vital cuando se diagnostica en un entorno clínico. Junto con otras pruebas de hepatitis B, el marcador anti-HBc permite un correcto diagnóstico y un adecuado seguimiento del progreso del virus. Anti-HBc posiblemente sea el único indicador de una infección por hepatitis B (incluidas otras pruebas de pacientes HBsAg negativos).

Principio:

Esta prueba ELISA de HBcAb se basa en el principio competitivo de incubación de un solo paso en fase sólida. Cuando el anti-HBc está presente, compite con el anti-HBc monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP-Conjugado) por una cantidad fija de HBcAg purificado recubierto previamente en los pocillos. Si no hay anti-HBc presente, el anti-HBc conjugado con HRP se unirá junto con los antígenos dentro de los pocillos. En el transcurso del lavado, se elimina cualquier HRP-Conjugado no unido. Después de añadir las soluciones de cromógeno A y B a los pocillos y durante la incubación, aparece un producto de color azul cuando los cromógenos incoloros son hidrolizados por el conjugado de HRP unido. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico, el color azul se vuelve amarillo. La presencia de anticuerpos contra HBcAg en la muestra se indica por un color bajo o por la ausencia total de color.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 × 12 tiras, 96 pocillos.
- Control Positivo, 1 vial, 1 mL.
- Control negativo, 1 vial, 1 mL.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 6 mL.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 20 mL (concentrado 20X).
- Sustrato A, 1 vial, 6 mL.
- Sustrato B, 1 vial, 6 mL.
- Solución de parada, 1 vial, 6 mL.
- Bolsa plástica, 1 unidad.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 2 piezas.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministren varias medidas con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua desmineralizada.

Precauciones y Advertencias:

Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de este producto resultó negativo para la presencia de anticuerpos contra el VIH-

1/VIH-2, así como para el antígeno de superficie de la hepatitis B, utilizando un método comercial autorizado. No obstante, debido a que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad completa de la ausencia de agentes infecciosos, este producto debe manipularse con precaución.

- Evite el contacto de los reactivos con los ojos y la piel. Si eso ocurre, lávese bien con agua.
- Use guantes.
- No pipetear con la boca.
- No fume.
- Deseche todos los materiales usados en un contenedor adecuado para desechos biopeligrosos. Los restos de muestras, controles, reactivos aspirados y puntas de pipeta deben recogerse en un recipiente para este fin y esterilizarse en autoclave durante 1 hora a 121°C o trate con hipoclorito de sodio al 10 % (concentración final) durante 30 minutos antes de su eliminación. (Los restos que contengan ácido deben neutralizarse previamente a la adición de hipoclorito de sodio).
- Ajuste el lavado de la placa utilizada (fondo plano) para lavar correctamente.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- No utilice reactivos después de la fecha de caducidad.
- Se debe tener mucho cuidado para evitar la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de los reactivos.
- Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra y cada reactivo.
- Los jabones y/o oxidantes que queden en los recipientes utilizados para la solución sustrato-TMB pueden interferir en la reacción.

Almacenamiento y Estabilidad:

Los kits de prueba sin abrir deben almacenarse entre 2 y 8°C al recibirlos y la microplaca debe guardarse en una bolsa sellada para minimizar la exposición al aire húmedo. Use los reactivos lo antes posible después de desempacar el kit.

Recolección y Preparación de Muestras:

El suero debe prepararse a partir de una muestra de sangre total obtenida mediante técnicas médicas aceptables. En esta prueba se puede utilizar suero o plasma. Retire el suero o el plasma del coágulo o de las células sanguíneas lo antes posible para evitar la hemólisis. Las muestras con gran cantidad de partículas deben clarificarse mediante centrifugación antes de su uso. Se pueden utilizar muestras congeladas a -20°C o menos. Evite congelar y descongelar repetidamente.

Procedimiento de Prueba:

- Lleve el kit ELISA para anticuerpos contra el antígeno Core del virus de la hepatitis B (todos los reactivos) y las muestras a temperatura ambiente antes de usarlas (aproximadamente 30 minutos).
- Diluya la solución de lavado concentrado 1:19 con agua desmineralizada.
- Identifique los pocillos de la microplaca para el control y la muestra del paciente que se analizará. Vuelva a colocar las tiras de micropocillos no utilizadas en la bolsa, selle y guárdela a 2-8 °C.
- Agregue 50 µl del control o las muestras en el pocillo asignado.
- Agregue 50 µl de conjugado en cada pocillo excepto en el blanco.
- Cubra la placa con la tapa de la placa e incube durante 30 minutos a 37°C.
- Al final de la incubación, retire y deseche la cubierta de la placa. Lave cada pocillo 5 veces con tampón de lavado diluido. Cada vez, permita que los micropocillos se empapen durante 30 a 60 segundos. Después del último ciclo de lavado, coloque el plato sobre papel secante o una toalla limpia y golpéelo suavemente para eliminar los restos.
- Agregue 50 µl de solución de sustrato A y 50 µl de solución de sustrato B en cada pocillo. Incubar durante 10 minutos a 37°C evitando la luz.
- Utilizando una pipeta multicanal o manualmente, agregue 50 µl de solución de parada en cada pocillo y mezcle suavemente.
- Calibre el lector de placas con el pozo en blanco y lea la absorbancia a 450 nm. Si se utiliza un instrumento de doble filtro, establezca la longitud de onda de referencia en 630 nm. Calcule el valor de corte y evalúe los resultados. (Nota: lea la absorbancia dentro de los 10 minutos después de detener la reacción).

Cálculos y Control de Calidad:

Cada microplaca debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo, independientemente del número de placas procesadas simultáneamente. Los resultados se calculan relacionando el valor de absorbancia (A) de cada muestra con el valor de corte (C.O.) de la placa. Si la lectura de corte se basa en un lector de placa de filtro único, los resultados deben calcularse restando el valor del pocillo blanco A de los valores del informe de impresión de las muestras y los controles. En caso de que la lectura se base en un lector de placas de doble filtro,

no reste el valor del pocillo blanco A de los valores del informe de impresión de muestras y controles.

Control de Calidad:

Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de control de calidad. Se recomienda que cada laboratorio establezca un sistema de control de calidad apropiado con material de control de calidad similar o idéntico a la muestra del paciente que se analiza.

• **Valor de Corte, Cut-Off (C.O.)** = $PC \times 0,6 + NC \times 0,4$ (PC = el valor medio de absorbancia de dos controles positivos NC = el valor medio de absorbancia de dos controles negativos).

Importante: Si el NC es superior a 1,5, tómallo como 1,5.

Ejemplo:

Valor del Blanco: A1= 0.025 at 450nm (Nota: Requerido sólo cuando se lee a 450nm)

Absorbancia del Control Negativo:	B1	C1
	1.838	1.952
Absorbancia del Control Positivo:	D1	E1
	0.020	0.022

$$\text{Cálculo de CP:} = \frac{(0.020+0.022)}{2} = 0.021$$

$$\text{Cálculo of CN:} = \frac{(1.838+1.952)}{2} = 1.895$$

Cálculo del Corte, Cut-off: (C.O.) =

$$PC \times 0,6 + NC \times 0,4 = 0,021 \times 0,6 + 1,5 \times 0,4 = 0,613$$

Resultados Negativos: (A / C.O. > 1): Las muestras que arrojan una absorbancia superior al valor de corte son negativas para este ensayo, lo que indica que no se ha detectado HBcAb con este kit ELISA.

Resultados Positivos: (A/C.O. ≤ 1): Las muestras que arrojan una absorbancia inferior al valor de corte se consideran inicialmente reactivas, lo que indica que probablemente se detectó HBcAb con este kit ELISA. Todas las muestras inicialmente reactivas deben volver a analizarse por duplicado con este kit ELISA antes de la interpretación final de los resultados del ensayo. Las muestras repetidamente reactivas podrían considerarse positivas para HBcAb y este resultado no debe usarse solo para establecer el estado de infección.

En el Límite: (A/C.O. = 0,9-1,1): las muestras con una razón de absorbancia a valor límite entre 0,9 y 1,1 se consideran en el límite y es necesario volver a analizar estas muestras por duplicado para confirmar los resultados iniciales.

Se requiere seguimiento, confirmación y pruebas complementarias de cualquier muestra positiva con otro sistema analítico. El diagnóstico clínico no debe establecerse sobre la base de un solo resultado de prueba. Debe integrar datos y hallazgos clínicos y de laboratorio.

- Si, después de volver a analizar las muestras inicialmente reactivas, ambos pocillos arrojan resultados negativos (A/C.O. > 0,9), estas muestras deben considerarse como positivas no repetibles (o falso positivo) y registrarse como negativas. Al igual que con muchos ensayos ELISA muy sensibles, pueden producirse resultados falsos positivos debido a varios motivos, la mayoría de los cuales están relacionados, entre otros, con un paso de lavado inadecuado.

- Si después de repetir la prueba por duplicado, uno o ambos pocillos dan resultados positivos, el resultado final de esta prueba ELISA debe registrarse como reactivo repetidamente. Las muestras repetidamente reactivas podrían considerarse positivas para HBcAb.

- Después de volver a realizar la prueba por duplicado, las muestras con valores cercanos al valor de corte deben interpretarse con precaución y considerarse como una muestra de zona "Límite" o no interpretable para el momento de la prueba.

Especificidad Clínica:

La especificidad clínica de este kit ha sido evaluada por un panel de muestras obtenidas de 1683 donantes de sangre sanos y 145 pacientes hospitalizados sin diagnosticar. Las muestras repetidamente reactivas y las muestras confirmadas como positivas con la prueba de referencia no se incluyeron en el cálculo de la especificidad.

Sensibilidad Clínica:

Para calcular mediante un panel de muestras obtenidas de 975 pacientes con hepatitis B con un historial clínico bien caracterizado basado en ensayos de referencia para la detección de HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe y anti-HBc. Este panel incluyó muestras de pacientes con hepatitis B aguda, crónica y recuperada. Se utilizó una prueba ELISA anti-

HBc autorizada como ensayo de confirmación. Los resultados de la evaluación se dan a continuación. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

Muestra	Número de Muestras	-	+	Positivos Confirmado	Especificidad	Falso Positivo
Donantes	1683	566	1117	1115	99.64%	2
Hospital	145	80	65	65	100.00%	0
Total	1828	646	1182	1180	99.82%	2

	Número de Muestra	-	+	Confirmado	Sensibilidad	Falso Negativo
Agudo	429	11	417	418	99.76%	1
Crónico	105	0	105	105	100%	0
Recuperación	441	5	436	436	100%	0
Total	975	16	958	959	99.82%	1

Especificidad Analítica:

No se observó reactividad cruzada con muestras de pacientes infectados con HAV, HCV, HIV, CMV y TP.

No se observó interferencia de factores reumatoides hasta 2000U/ml.

También se han probado muestras congeladas para comprobar si hay interferencias debidas a la recogida y el almacenamiento.

Puede ocurrir un resultado positivo no repetible debido a la biología general de los ensayos ELISA. Este ensayo está diseñado para lograr características de muy alto rendimiento de sensibilidad y especificidad, y el "modelo sándwich" minimiza las reacciones inespecíficas debidas a la interferencia con materias desconocidas en la muestra. Sin embargo, en casos muy raros, algunos mutantes o subtipos de VHB pueden permanecer indetectables. Un resultado negativo con una prueba de detección de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.

Si, después de volver a analizar las muestras inicialmente reactivas, los resultados del ensayo son negativos, estas muestras deben considerarse no repetibles (falso positivo) e interpretarse como negativas. Al igual que con muchos ensayos ELISA muy sensibles, pueden producirse resultados falsos positivos debido a varios motivos, la mayoría de los cuales están relacionados, entre otros, con un paso de lavado inadecuado. Cualquier resultado positivo debe interpretarse junto con la información clínica del paciente y otros resultados de laboratorio.

Cualquier resultado positivo debe interpretarse junto con la información clínica del paciente y otros resultados de pruebas de laboratorio.

Fuente común de errores: kits más allá de la fecha de caducidad, malos procedimientos de lavado, reactivos contaminados, pasos incorrectos del procedimiento de ensayo, aspiración insuficiente durante el lavado, falta de adición de muestras o reactivos, equipo, tiempo, volúmenes, naturaleza y calidad de las muestras.

La prevalencia del marcador afectará los valores predictivos del ensayo.

Las muestras analizadas con kits de prueba de diferentes fabricantes pueden dar resultados cualitativos similares, pero algunas muestras pueden dar discrepancias debido a la diversidad de anticuerpos y las propiedades antigénicas del HBcAb utilizado en el ensayo.

Este kit está diseñado ÚNICAMENTE para analizar muestras individuales de suero o plasma. No lo use para analizar muestras de cadáveres, saliva, orina u otros fluidos corporales, o sangre acumulada (mezclada).

Este es un ensayo cualitativo y los resultados no pueden usarse para medir concentraciones de anticuerpos.

Referencias:

1. Takahashi, K. et al. (1976). Association of Dane particles with e antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. J. Immunol., 117, 102
2. Cappel, R. et al. (1977). E antigen and antibody DNA polymerase and inhibitors of DNA polymerase in acute and chronic hepatitis. J. Infect. Dis., 136, 617.3. A new antigen-antibody system. Clinical significance in long-term carriers of hepatitis B surface antigen. J. Am. Med. Assoc., 231, 356. Bruss V, et al.

