



CE  
0344

# **Anti-HBc IgM Elisa**

***KAPG4CME3***



# History

---

**Resume of change :**

<b>Previous Version :</b>	<b>Current Version :</b>
170224/1	191024/1
/	Addition of Manufacturer symbol
/	Addition of IVD symbol
/	Addition of CLP hazard symbols
/	Addition of Residual risk
P.I. Number : 1701153	P.I. Number cleared
No history	History added




# Anti-HBc IgM Elisa

en

For in vitro qualitative detection of IgM antibody to hepatitis B virus core antigen (Anti-HBc IgM) in human serum or plasma

KAPG4CME3

IN VITRO DIAGNOSTIC USE **IVD**

 DIAsource ImmunoAssays SA – Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1) INTENDED USE

**ANTI-HBc IgM ELISA** is an enzyme immunoassay for in vitro qualitative detection of IgM antibody to hepatitis B virus core antigen (Anti-HBc IgM) in human serum or plasma (heparin, EDTA or citrate).

## 2) SUMMARY AND TEST EXPLANATION

The hepatitis B virus (HBV) consists of an external envelope (HBsAg) and an inner core (HBcAg). In acute HBV infection, IgM antibodies to HBcAg (Anti-HBc IgM) are detectable in serum or plasma shortly after the onset of viral replication and remain in the circulation for about 7 to 17 weeks. The detection of anti-HBc IgM antibodies is used, in conjunction with HBsAg determination, as indicative marker of the phase of the infection and for the monitoring of patients under treatment with interferon. High anti-HBc IgM titers can be found in acute HBV infection and in attacks during chronic hepatitis B. The level of anti-HBc IgM decreases throughout the course of infection. However, low levels of anti-HBc IgM may persist for over a year after infection in some patients and are found occasionally in chronic carriers.<sup>1-6</sup>

**ANTI-HBc IgM ELISA** is a fast test for the qualitative detection of the presence of IgM antibodies to HBcAg in serum or plasma (heparin, EDTA or citrate) specimens. The test utilizes Anti-human IgM on microtiter wells as solid phase and HBcAg and peroxidase-conjugated Anti-HBc in liquid phase in an "IgM capture" principle to detect Anti-HBc IgM levels in serum or plasma.

Specimens with absorbance values  $\leq 0.9 \times$  signal/cutoff ratio are considered **NON-REACTIVE** for Anti-HBc IgM. Specimens with absorbance values  $\geq 1.1 \times$  signal/cutoff ratio are considered **REACTIVE** for Anti-HBc IgM. If the signal/cut-off ratio is within Retest Range (0.9 - 1.1), the test must be repeated in duplicate and interpreted as above.

## 3) TEST DESCRIPTION

ANTI-HBc IgM ELISA is a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay) — based on the principle of "**Anti-HBc IgM**". The solid phase of the microtiter plate is made of polystyrene wells coated with anti-human IgM.

When a serum or plasma specimen containing Anti-HBc IgM is added to the Anti-human IgM-coated wells and incubated, IgM antibodies present in the specimen bind to the Anti-h IgM on the wells. After addition of an HBcAg-containing reagent and a solution containing peroxidase-conjugated anti-HBc a further incubation takes place, during which (Anti-h IgM) • (Anti-HBc IgM) • (HBcAg) • (Anti-HBc• peroxidase) complex is formed on the wells. After washing the microtiter plate to remove unbound material, a solution of TMB substrate is added to the wells and incubated. If Anti-HBc IgM is present in the specimen, after washing, the activity of peroxidase on the wells reflects the content of anti-HBc IgM in a specimen. The peroxidase-TMB reaction is stopped by addition of sulfuric acid. The optical density of developed color is read with a suitable photometer at 450 nm with a selected reference wavelength within 620 to 690 nm<sup>8</sup>

The above described test principle is shown also in the following figure.

### A. Specimen (containing human IgM Anti-HBc):


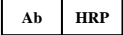
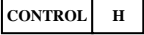
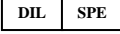


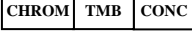
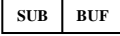
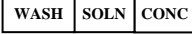
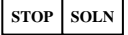
1. Plate (Anti-h IgM) + specimen (containing Anti-HBc IgM) → plate (Anti-h IgM) • Anti-HBc IgM
2. Plate (Anti-h IgM) • Anti-HBc IgM + HBcAg + Anti-HBc • peroxidase → plate (Anti-h IgM) • Anti-HBc IgM • HBcAg • (Anti-HBc• peroxidase) complex
3. Wash to remove the unbound materials.
4. Plate (Anti-h IgM) • IgM Anti-HBc IgM • HBcAg • (Anti-HBc • HRPO) complex + TMB substrate solution → light blue to blue color
5. Light blue to blue color + sulfuric acid → light yellow to yellow color, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm<sup>8</sup>

### B. Specimen (without IgM Anti-HBc):

1. Plate (Anti-h IgM) + specimen (without Anti-HBc IgM) → plate (Anti-h IgM)
2. Plate (Anti-h IgM) + HBcAg + Anti-HBc • peroxidase → plate (Anti-h IgM)----- no complex will form
3. Wash to remove the unbound materials.
4. Plate (Anti-human IgM) + TMB substrate solution (colorless) → colorless
5. Colorless + sulfuric acid → colorless, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm<sup>8</sup>

#### 4) DESCRIPTION OF MATERIALS PROVIDED

- Item 1 - 8 on the following reagent table should be refrigerated at +2 to +8°C . Washing Solution (20X) and stop solution can be stored at +2 to +30°C.

ITEMS	Components	Description	Qt. per 96 tests
(1)	 Anti-IgM Microtiter Plate	One microtiter plate (removable strips) with 96 wells coated with Anti-human IgM.	1 plate
(2)	 Anti-HBc • Peroxidase Solution	Anti-HBc (human) • peroxidase (horseradish) conjugate in buffer with protein stabilizer. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1bottle, 8 ml
(3)	 Anti-HBc IgM Positive Control	Human Anti-HBc IgM in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 2.5 ml
(4)	 Specimen Diluent	Buffer containing protein stabilizers. Preservatives: 0.003%Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	2 bottles 36 ml
(5)	 HBcAg Reagent	HBcAg in buffer containing protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 8 ml
(6)	 Anti-HBc IgM Negative Control	Normal (Anti-HBc IgM negative) human serum containing protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 2.5 ml
(7)	 Chromogenic TMB concentrate	0.6 mg/ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic phase.	1 bottle, 12 ml
(8)	 Substrate buffer	Citric acid buffer containing 0.03% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	1 bottle, 12 ml
(9)	 Conc. Washing Solution (20x)	Phosphate buffer with Tween-20.	1 bottle 58 ml
(10)	 Stop Solution	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sulfuric acid)	1 bottle 12 ml

#### • OTHER MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

ITEMS	Components
(1)	5µl, 50µl and 100 µl micropipettes and tips are needed
(2)	Incubator or waterbath with temperature control at +37 ±1°C
(3)	Tubes for specimen dilution.
(4)	Plate washing equipment.
(5)	Purified water: distilled or deionized water.
(6)	ELISA microwell reader: Dual wavelength 450nm with 620-690nm as reference wavelength <sup>®</sup> , bandwidth 10nm.
(7)	Fully automatic EIA micro-plate analyzer is optional. User should validate the automatic EIA micro-plate analyzer in combination with the kit.






#### 4.1) Storage Conditions and Stability of Kit and Components

Kit/components	Storage condition	State	Stability
ANTI-HBc IgM ELISA KIT	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HBc IgM Positive Control	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HBc IgM Negative Control	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month

HBcAg Reagent	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Specimen Diluent	+2 to +8 °C	Original	16 months
		Once open	1 month
Anti-human IgM Plate	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	2 months
Anti-HBc • Peroxidase Conjugate Solution	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Concentrated Washing Solution (20x)	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month
20x Diluted Washing Solution	Room temp.	Diluted	2 days
	+2 to +8 °C	Diluted	1 week
Chromogenic TMB concentrate	+2 to +8 °C	Original	24 months
		Once open	1 month
Substrate buffer	+2 to +8 °C	Original	24 months
		Once open	1 month
Stop Solution	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month

## 5) INSTRUCTION FOR USE

### 5.1) Warnings:

- 5.1.1) This reagent kit is for professional use only.
- 5.1.2)  This reagent kit is for *in vitro* diagnostic use only.
- 5.1.3) Bring all kit reagents and samples to room temperature (+20 to +30 °C) and mix carefully before use.
- 5.1.4) Do not use reagent beyond its expiration date.
- 5.1.5) Do not interchange reagents between different lots.
- 5.1.6) Do not pipette in the mouth.
- 5.1.7) Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.
- 5.1.8) The positive control, negative control, HBcAg Reagent, conjugate solution and specimens should be regarded as potential hazards to health. They should be used and discarded according to the user's laboratory safety procedures. Such safety procedures probably will include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols.
- 5.1.9) Potential infectious specimens and non-acid containing spills or leakages should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite or treated in accordance with the laboratory's practice for potential bio-hazard control.
- 5.1.10) Prior to dispose the waste of used specimens and kit reagents as general waste, it should be treated in accordance with the local procedures for potential bio-hazardous waste or treated as follows:  
Both liquid and solid waste should be autoclaved maintaining +121 °C for at least 30 minutes.  
Solid waste can also be incinerated.  
Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%.  
Acidic liquid wastes must be neutralized before treatment with sodium hypochlorite as mentioned above and should stand for 30 minutes to obtain effective disinfection.
- 5.1.11)  Stop solution is an irritant to skin, eyes, respiratory tract and mucous membranes. Avoid contact of the stop solution with skin and mucous membranes. In case of contact, clean with large lots of water immediately. In case of inhalation, supply fresh air and seek medical advice in case of complaints.
- 5.1.12)   Chromogenic TMB concentrate contains organic solvent which is toxic: danger of serious irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed. Chromogenic TMB concentrate contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes.
- 5.1.13)  Although all human sourced material are tested non-reactive for Anti-HCV and Anti-HIV, and inactivated at +56 °C for one hour, the reagent shall be handled as potential infectious material.<sup>7</sup>

### 5.2) Residual risks

- 5.2.1) Incorrect operation could lead to wrong results.
- 5.2.2) Using the kit after expiration date might lead to wrong results.
- 5.2.3) Inefficient Washer and ELISA Reader could affect the final result.
- 5.2.4) Storage at higher temperature could affect the shelf life of the product.
- 5.2.5) The product is for single use only. Reuse could lead to wrong results.
- 5.2.6) Any change to the test procedure may lead to incorrect results which could cause diagnostic error.

### 5.3) Specimen Collection and Preparation for Analysis

- 5.3.1) No special preparation of the patient is required prior to blood collection. Blood should be collected by approved medical techniques.
- 5.3.2) Either serum or plasma can be used with this diagnostic kit. Whole blood specimen should be separated as soon as possible in order to avoid hemolysis. Any particulates (e.g. fibrin clots, erythrocytes) contained in the specimen should be removed prior to use.
- 5.3.3) Specimens must be stored at +2 to +8 °C and avoided heat-inactivation to minimize deterioration. For long-term storage, specimens should be frozen below -20 °C. Storage in self-defrosting freezers is not recommended.
- 5.3.4) Frozen specimens must be thoroughly thawed and mixed homogeneously before test.
- 5.3.5) Avoid multiple freeze-thaw procedures

#### 5.3.6) WARNING

1. The specimen must not contain any compounds of AZIDE, which inhibits the peroxidase activity.
2. Incompletely coagulated serum samples and microbial-contaminated specimens should not be used.

### 5.4) Reagents Storage

- 5.4.1) The kit must be stored at + 2 to +8 °C. Do not freeze.
- 5.4.2) Strips of the plate should be used within 2 months after opening the original aluminum foil bag. The unused strips should be kept in the aluminum foil bag and taped the opening tightly.
- 5.4.3) Return reagents to +2 to +8 °C immediately after use.
- 5.4.4) Washing Solution (20x) Concentrate is stored and shipped at +2 to +8 °C, which can cause crystallization. If crystal has been precipitated before use, warm up the solution in +37 °C water bath till the crystal is dissolved.

### 5.5) Plate washing procedure

- 5.5.1) Preparation of washing solution:  
Dilute Washing Solution (20x) Concentrate with distilled or de-ionized water to 1:20 dilution. Do not use tap water.
- 5.5.2) Plate washing:
  - (a) For plate washer with overflow aspirating function: 6 cycles with at least 0.5ml washing buffer per well per cycle  
or
  - (b) For plate washer without overflow aspirating function: 8 cycles with at least 0.35ml washing buffer per well per cycle.
- 5.5.3) Blot dry by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. Too much residual wash buffer will cause false results.



#### WARNING

Improper washing will cause false results.

### 5.6) Test Procedure

- 5.6.1) Bring all reagents and specimens to room temperature (+20 to +30 °C) before assay. Adjust water bath or incubator to +37±1 °C.
- 5.6.2) Make 1+100 dilution of each specimen:  
Prepare for each specimen a tube for dilution, with exception of the controls. Add 500 µl of Specimen Diluent and 5 µl of each specimen to each tube respectively and shake to mix.



#### NOTE:

- a) Do not dilute the controls.
- b) Use a new pipette tip after each sampling to avoid cross-contamination.
- 5.6.3) Reserve one well for Blank. Add 100 µl of Negative Control to each three wells, 100 µl of Positive Control to each two wells, 100 µl of Specimen Diluent to each of the other reaction wells for test specimen.
- 5.6.4) Add 5 µl of each diluted specimen to each well containing Specimen Diluent, respectively.
- 5.6.5) Gently tap the plate.
- 5.6.6) Remove the protective backing of the adhesive slip and press it on the reaction plate, so that it is tightly sealed.
- 5.6.7) Incubate the plate at +37 °C for 1 hour.
- 5.6.8) At the end of the incubation period, remove and discard the Adhesive Slip and wash plate by following "5.4. PLATE WASHING PROCEDURE".
- 5.6.9) Add 50 µl of HBcAg reagent to each reaction well except the Blank followed by 50 µl of Anti-HBc-Peroxidase solution. Apply a new adhesive slip.
- 5.6.10) Incubate the plate at +37 ± 1°C °C for 1 hour.
- 5.6.11) At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive slip, wash the plate by following "5.4. PLATE WASHING PROCEDURE".
- 5.6.12) Select one of the following two methods for color development:
  - A. Mix equal volumes of **Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer** in a clean container immediately prior to use. Add **100 µl** of the mixture solution to each well including the blank well.
  - B. Add **50 µl** of **Chromogenic TMB concentrate** first, and then add **50 µl** of **Substrate buffer** into each well including the blank. Mix well gently .



**NOTE:** Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue; otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and substrate buffer should be used within 30 minutes after mix. The mixture should be protected from exposition to intense light.

- 5.6.13) Cover the plate with the black cover and incubate at room temperature for 30 minutes.

- 5.6.14) Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well including the blank.  
 5.6.15) Determine the absorbance of controls and test specimens within 15 minutes with a precision photometer at 450 nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm<sup>8</sup>.  
 Use the blank well to blank the photometer.



**NOTE:** The color of the blank should be colorless to light yellowish; otherwise, the test result is invalid. In this case the tests must be repeated.  
 Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100.

### 5.7) Calculation of Test Results

5.7.1) Calculation of the NCx (Mean Absorbance of Negative Control).

Example:

Sample No.	Absorbance
1	0.068
2	0.072
3	0.070

$$NCx = (0.068 + 0.072 + 0.070) / 3 = 0.070$$



**NOTE:** NCx must be  $\leq 0.1$ , otherwise, the test is invalid.

5.7.2) Calculation of PCx (Mean Absorbance of Positive Control)

Example:

Sample No.	Absorbance
1	1.612
2	1.613

$$PCx = (1.612 + 1.613) / 2 = 1.613$$



**NOTE:** PCx must be  $\geq 0.4$ , otherwise, the test is invalid.

5.7.3) Calculation of P-N Value

$$P-N = PCx - NCx$$

Example:

$$P - N = 1.613 - 0.070 = 1.543$$



**NOTE:** P - N Value must be  $\geq 0.3$ , otherwise, the test is invalid.

5.7.4) Calculation of the Cutoff Value

$$\text{Cutoff Value} = NCx + (PCx)/4$$

Example:

$$\text{Cutoff Value} = 0.070 + (1.613)/4 = 0.473$$

5.7.5) Calculation of the Retest Range

$$\text{Retest Range} = \text{Cutoff Value} \pm 10\%$$

Example: Cutoff Value = 0.473

$$\text{Retest Range} = (0.473 - 0.047) \text{ to } (0.473 + 0.047) = 0.426 \text{ to } 0.520$$

### 5.8) Validity of Test Runs

5.8.1) NCx must be  $\leq 0.1$ , otherwise, the test is invalid.

5.8.2) PCx must be  $\geq 0.4$ , otherwise, the test is invalid.

5.8.3) P-N Value must be  $\geq 0.3$ , otherwise, the test is invalid.

### 5.9) Interpretation of Results

Specimens with signal/cut-off ratio  $\leq 0.9$  are considered non-reactive for Anti-HBc IgM. Specimens with signal/cut-off ratio  $\geq 1.1$  are considered reactive for Anti-HBc IgM.

If the signal/cut-off ratio is within Retest Range (0.9 - 1.1), the test must be repeated in duplicate and interpreted as above. If both results are non-reactive the final result is non-reactive, if both results are reactive the final result is reactive. Any other combination is an indeterminate result. Testing of follow up samples and other hepatitis B serological markers should be taken into account in case of an indeterminate result.



**NOTE:**

Interpretation of Results: The result of an Anti-HBc IgM test should always be interpreted taking into account other hepatitis B serological and NAT markers as well as clinical symptoms.

### 5.10) Troubleshooting

If the result cannot be reproduced, a preliminary troubleshooting should be performed by checking the possibilities listed below:

- 5.10.1) Improper washing procedure.
- 5.10.2) Contaminated with positive specimen.
- 5.10.3) Wrong volume of sample, conjugate or substrate.
- 5.10.4) Contamination of well rim with conjugate.
- 5.10.5) Improper specimen such as hemolyzed serum or plasma, specimen containing precipitate and specimen not thoroughly mixed before use.
- 5.10.6) Wrong incubation time or temperature.
- 5.10.7) Obstructed or partial obstructed washer aspirate/dispense head and needles.
- 5.10.8) Insufficient aspiration.

### 5.11) Limitations and Interferences

- 5.11.1) This reagent kit is to be used for un-pooled human serum or plasma samples only. It cannot be used for testing of non-human serum or plasma samples.
- 5.11.2) The reagent kit has not been validated for use with cadaveric samples.



- 5.11.3) Non-repeatable false positive results may be obtained with any enzyme immunoassay kits, largely due to technical error either on the part of the operator or malfunction of apparatus used.
- 5.11.4) When Anti-HBc IgM test results are used to differentiate acute from non-acute HBV infections, the clinical history of the patient and the results of other markers (if available) shall be taken into account.
- 5.11.5) A negative Anti-HBc IgM result does not preclude the possibility of previous infection with HBV.
- 5.11.6) Potential interfering substances:  
Potential interfering samples, i.e. samples with hyperlipemia, hemolysis, hyper-bilirubinemia, samples with monoclonal immunoglobulin components, samples containing elevated levels of autoimmune antibodies (rheumatoid factor-RF, antinuclear antibodies-ANA, or anti-mitochondrial antibodies-AMA) did not affect the test result with the present Anti-HBc IgM ELISA.
- 5.11.7) The anticoagulants heparin, EDTA and sodium citrate have no influence on the specificity of ANTI-HBc IgM ELISA and can be used to obtain plasma samples for analysis with the present Anti-HBc IgM kit.

**5.12) Performance Characteristics**

**5.12.1) Diagnostic Specificity**

Characteristics of the samples	No. of sample	Negative Result	
		Reference Assay	ANTI-HBc IgM Assay
Clinical/hospitalized patients (HBV negative 'clinical')	200	200	200
Blood donors (HBV/Anti-HBc negative 'donors')	200	198	200
Sample containing potentially interfering substances	50	50	50
Total	450	448	450
Diagnostic Specificity	-----	99.5%	<b>100%</b>

**5.12.1.1) Potential interfering substances**

Potential interferences with the ANTI-HBc IgM assay were investigated. For each potential interfering substance, at least two serum samples containing different amounts of the potentially interfering substance were mixed in fixed ratios of 10 + 0; 7 + 3; 5 + 5; 3 + 7; 0 + 10 with other serum samples containing increased Anti-HBc IgM levels but no interfering factors. The neat samples as well as the mixtures were analyzed.

In particular the specificity study included:

- lipemic (turbid) samples before and after high speed centrifugation
- hemolytic samples or hemolysate
- icteric samples (=hyperbilirubinemia)
- samples with monoclonal immunoglobulin components
- samples containing elevated levels of autoimmune antibodies (rheumatoid factor - RF, antinuclear antibodies – ANA, or antimitochondrial antibodies-AMA)

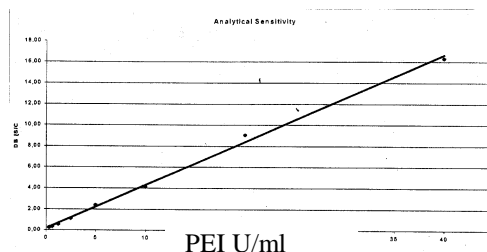
No interference was detected with both used lots, neither the type of anticoagulant had an influence on both tested lots of ANTI-HBc IgM ELISA.

**5.12.2) Analytical Sensitivity and Linearity:**

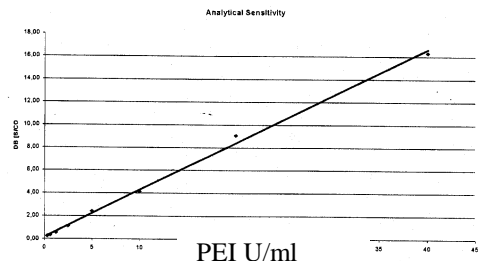
**5.12.2.1) Detection limit using dilution of Anti-HBc IgM Reference Materials:**

A serial dilutions of the Paul Ehrlich Institute (PEI) (Langen, Germany) Standard Material for Anti-HBc IgM (100 PEI U/ml) was used to evaluate the analytical sensitivity (detection limit) of ANTI-HBc IgM ELISA. The analytical sensitivity (detection limit) was defined as the lowest concentration that can be detected. Both lots of ANTI-HBc gGM ELISA had an analytical sensitivity at 2.5 PEI U/ml, better than the reference assay by one twofold dilution.

Analytical Sensitivity of Lot #B44333PT  
S/C vs Concentration

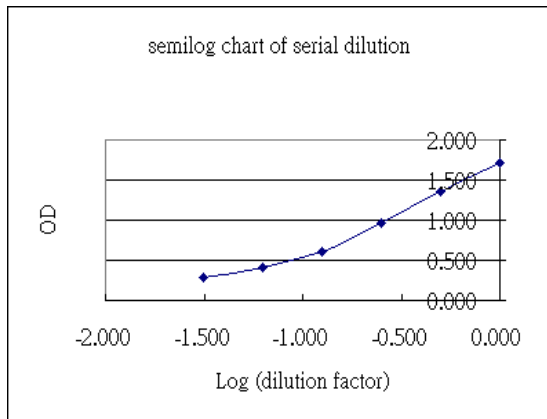


Analytical Sensitivity of Lot #B44334PT  
S/C vs Concentration

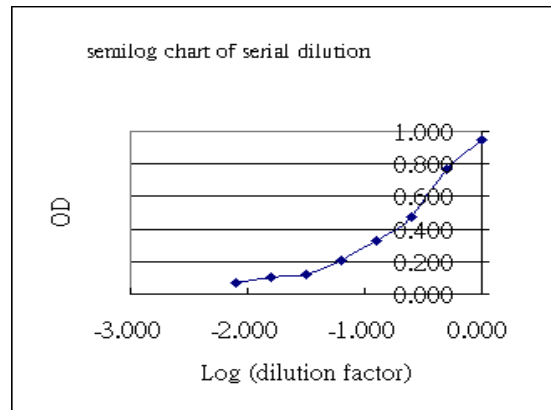


### 5.12.2.2) Linearity using blood samples

Linearity was evaluated with 2 lots of ANTI-HBc IgM ELISA using high Anti-HBc-IgM positive serum samples after diluting them throughout the measuring range and then around the cutoff level in narrow dilution steps.



Linear Range: OD from 1.714 to 0.290  
Linearity (semilog chart): R = 0.983



Linear Range: OD from 0.95 to 0.118  
Linearity (semilog chart): R = 0.980

### 5.12.3) Diagnostic Sensitivity

Positive specimens/Specimens used to evaluate the diagnostic sensitivity/ Patients with HBV infection.

#### 5.12.3.1) HBV infected individuals

207 known Anti-HBc-IgM positive samples were tested in the ANTI-HBc IgM ELISA, in which 199 of these 207 samples were detected as positive, 1 as negative and 7 as indeterminate.

The resolved diagnostic sensitivity for the ANTI-HBc IgM ELISA was 96.1 % (199/207) and better than the sensitivity of the CE marked reference assay, which showed a resolved diagnostic sensitivity of 90.8 % (188/207), detecting 188 of these 207 samples as positive, 13 as negative and 6 as indeterminate.

Samples	ANTI-HBc IgM	Reference Assay
positive	199	188
negative	1	13
indeterminate	7	6
total	207	207
Resolved diagnostic sensitivity	96.1%	90.8%

#### 5.12.3.2) Commercial seroconversion panels

Eight commercially available seroconversion panels (from Boston Biomedica Inc., BBI; West Bridgewater, MA USA; Pyramid-Profile Diagnostics, Sherman Oaks, CA, USA and NABI, Boca Roton, FL, USA), consisting of follow-up samples which were collected at weekly or monthly intervals from patients suffering from acute hepatitis B, were used. All the panels had been characterized for HBV-specific serological markers (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc-IgM, and HBsAg).

When testing the seroconversion panels DIAsource ANTI-HBc IgM ELISA detected Anti-HBc IgM about 1 bleed earlier in the NABI panel RP-009 and the reference device detected the Anti-HBc IgM two bleeds earlier in the BBI Panel 935A and one bleed earlier in the Nabi panel RP-017. In summary there was no significant difference between the DIAsource ANTI-HBc IgM ELISA assay and the reference device.

### 5.12.4) Precision

#### 5.12.4.1) Intra-run repeatability

For determination of intra-assay (within-run) precision, the positive control and two patient serum samples with different Anti-HBc IgM titer (slightly above the cutoff level and at medium level) were analyzed in replicates of 20 in a single "run" over 3 days and the measured absorbance were registered.

The mean and the within-run coefficient of variation (CV) for the positive control and patient sample were calculated.

Item tested	Sample size	precision
Positive Control	N = 20	CV ≤ 17.31%
Patient Serum #1	N = 20	CV ≤ 20.11%
Patient Serum #2	N = 20	CV ≤ 13.53%

#### 5.12.4.2) Inter-run reproducibility

Item tested	Sample size	precision
Positive Control	N = 60	CV ≤ 12.83%
Patient Serum #1	N = 60	CV ≤ 12.00%
Patient Serum #2	N = 60	CV ≤ 8.24%

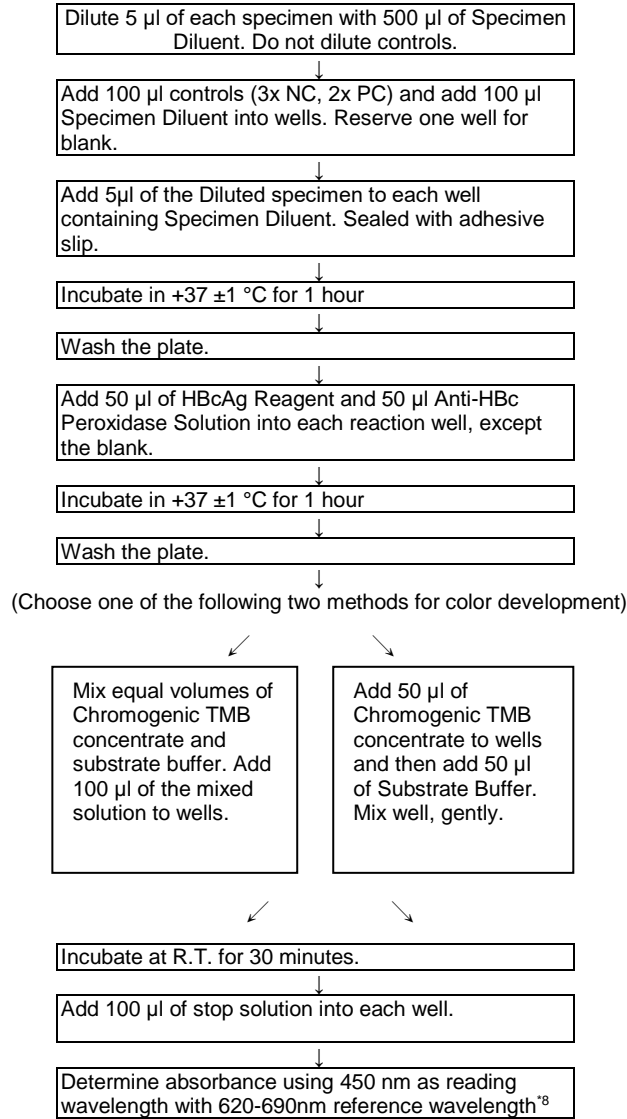
#### 5.12.5) Traceability

Concentration of Positive Control of ANTI-HBc IgM ELISA = 640 PEI U/ml ±30%

#### 5.12.6) Antibody Excess/High-dose Hook Effect

To check the antigen excess/high-dose hook effect of ANTI-HBc IgM ELISA two serum samples with a very high Anti-HBc IgM titer (OD ≥1.5) were tested in serial dilution. No antibody excess/high-dose hook effect was observed in the two samples.

### 5.13) Flow Chart of the Test Procedure



### 6) BIBLIOGRAPHY:

1. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF, Antibody to hepatitis B virus core in man. Lancet. 1973; 2(7834): 869-873.
2. Barker LF, Almeida JD, Hoofnagle JH, et al. Hepatitis B core antigen: immunology and electron microscopy. J Virol. 1974 Dec;14:1552-1558.
3. Hoofnagle. JH., Gerety, R.J., Ni, LY., Barker, LF. Antibody to Hepatitis B core antigen: A sensitive Indicator of hepatitis B virus replication. New Engl J Med. 1974;290:1336-1340.
4. Niermeijer, P., Gips, C. H., Huizenga, J. R. et al. IgM Anti-HBc as a marker of persistent and IgG anti-HBc as a marker of past hepatitis B infection. A longitudinal study over 5 years. Acta Hepato-Gastroenterol 1978;25: 360–364.
5. Kryger P: Significance of anti-HBc IgM in the differential diagnosis of viral hepatitis. J Virol Meth. 1985; 10: 283-289.
6. Hadziyannis SJ, Hadziyannis AS, Dourakis S, et al. Clinical significance of quantitative anti-HBc IgM assay in acute and chronic HBV Infection. Hepatogastroenterology 1993;40:588–592.
7. Shikata T, Karasawa T, Abe K, et al. Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at +60°C for 10 hours, J. Infect. Dis. 1978;138:242-244.

### Note :

8. The reference wavelength of spectrometer can be 620nm to 690nm. However, user should validate the photometer in combination with this kit before use.

Revision Date : 2019-10-24



# Anti-HBc IgM Elisa

es

Para la detección cualitativa in vitro del anticuerpo IgM contra el antígeno core del virus de la hepatitis B (IgM Anti-HBc) en suero o plasma humano

KAPG4CME3

PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO **IVD**



DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## 1) USO PREVISTO

**ELISA IgM ANTI-HBc** es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa in vitro del anticuerpo IgM contra el antígeno core del virus de la Hepatitis B (IgM Anti-HBc) en suero o plasma humano (heparina, EDTA o citrato).

## 2) RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El virus de la hepatitis B (VHB) está formado por una envoltura externa (HBsAg) y un núcleo interno (HBcAg). En infecciones agudas por VHB los anticuerpos IgM contra HBcAg (IgM Anti-HBc) se pueden detectar en el suero o plasma inmediatamente después del inicio de la replicación viral y permanece en circulación entre 7 y 17 semanas. La detección de anticuerpos IgM anti-HBc se usa, junto con la determinación de HBsAg, como un marcador indicativo de la fase de la infección y para monitorizar a los pacientes en tratamiento con interferón. Se pueden encontrar títulos altos de IgM anti-HBc en infecciones agudas con VHB y en ataques durante la hepatitis B crónica. El nivel de IgM anti-HBc disminuye a lo largo del curso de la infección. Sin embargo, niveles bajos de IgM anti-HBc pueden persistir por más de un año después de la infección en algunos pacientes y ocasionalmente se encuentra en portadores crónicos.<sup>1-6</sup>

**ANTI-HBc IgM Elisa** es un ensayo rápido para la detección cualitativa de la presencia de anticuerpos IgM contra HBcAg en muestras de suero o plasma (heparina, EDTA o citrato). El ensayo utiliza como fase sólida IgM anti-humana en los pocillos de la microplaca y HBcAg y Anti-HBc conjugado con peroxidasa en fase líquida en un principio de "captura de IgM" para detectar niveles de IgM anti-HBc en suero o plasma.

Muestras con absorbancias  $\leq 0,9$  x la relación de señal/corte se consideran **NO-REACTIVAS** para IgM anti-HBc. Muestras con absorbancias  $\geq 1,1$  x la relación de señal/corte se consideran **REACTIVAS** para IgM anti-HBc.

Si la señal/razón de corte está dentro del Rango de Repetición (0,9 – 1,1), el ensayo debe ser repetido en duplicado e interpretado como se ha indicado.

## 3) DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

ELISA IgM ANTI-HBc es un inmunoensayo enzimático de fase sólida (ELISA= *enzyme-linked immunosorbent assay*) — basado en el principio de "**Anti-HBc IgM**". La fase sólida de la microplaca está formada por pocillos de poliestireno recubiertos con IgM anti humana.

Cuando una muestra de suero o plasma que contiene IgM anti-HBc se agrega a los pocillos recubiertos con IgM anti humana y se incuban, los anticuerpos IgM presentes en la muestra se unen a la IgM anti humana en los pocillos. Después de agregar un reactivo que contiene HBcAg y una solución que contiene anti-HBc conjugado con peroxidasa hay otra incubación durante la cual se forma el complejo (IgM anti humano) • (IgM Anti-HBc) • (HBcAg) • (Anti-HBc peroxidasa) en los pocillos. Después de lavar la microplaca para eliminar el material que no se ha unido, se agrega una solución de sustrato TMB a los pocillos y se incuba. Si IgM anti-HBc está presente, en la muestra, después de lavar, la actividad de la peroxidasa en los pocillos refleja el contenido de IgM anti-HBc en la muestra. La reacción peroxidasa-TMB se detiene agregando ácido sulfúrico. La densidad óptica del color que se ha generado se mide con un fotómetro adecuado a 450 nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690 nm<sup>8</sup>

El principio del ensayo descrito anteriormente se ilustra también en el siguiente diagrama.

### A. Muestra (que contiene IgM anti-HBc humano):


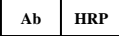
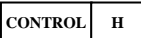
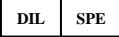



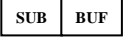

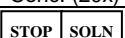
1. Placa (Anti- IgM humano) + muestra (que contiene IgM anti-HBc) → placa (Anti- IgM humano) • IgM Anti-HBc
2. Placa (Anti- IgM humano) • Anti-IgM HBc + HBcAg + Anti-HBc • peroxidasa → placa complejo (Anti-IgM humano) • IgM Anti- HBc • HBcAg • (Anti-HBc peroxidasa)
3. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
4. Placa complejo (Anti- IgM humano) • IgM Anti-HBc • HBcAg • (Anti-HBc • HRPO) + solución de sustrato TMB → de color celeste a azul
5. De color celeste a azul claro + ácido sulfúrico → de color amarillo pálido a amarillo, medido a 450nm con una longitud de onda seleccionada entre 620 y 690nm<sup>8</sup>

**B. Muestra (sin IgM Anti-HBc):**

1. Placa (Anti- IgM humano) + muestra (sin IgM Anti-HBc) → placa (Anti- IgM humano)
2. Placa (Anti- IgM humano) + HBcAg + Anti-HBc • peroxidasa → placa (Anti- IgM humano)----- no se formará un complejo
3. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
4. Placa (Anti- IgM humano) + solución de sustrato TMB (incolora) → incolora
5. Incolora + ácido sulfúrico → incolora, medida a 450nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690nm<sup>18</sup>

**4) DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS**

- Ítems 1- 8 de la siguiente tabla de reactivos deben mantenerse refrigerados entre + 2 y +8°C. La Solución de Lavado (20X) y la solución de parada pueden almacenarse entre +2 y +30°C.

ITEMS	Componentes	Descripción	Cant. para 96 ensayos
(1)	 Microplaca con Anti-IgM	Una microplaca (con tiras fraccionables) de 96 pocillos recubiertos con IgM anti humana.	1 placa
(2)	 Solución Anti-HBc • Peroxidasa	Conjugado de Anti-HBc (humano) • peroxidasa (rábano picante) en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 8 ml
(3)	 Control Positivo Anti-HBc IgM	IgM Anti-HBc humano en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%..	1 vial, 2.5 ml
(4)	Diluyente de la Muestra 	Tampón con estabilizadores de proteínas Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	2 viales 36 ml
(5)	 Reactivo HBcAg	HBcAg en tampón que contiene estabilizadores de proteínas. Conservantes: 0.003% Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial 8 ml
(6)	 Control Negativo IgM Anti-HBc	Suero humano normal (negativo para IgM Anti-HBc) con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%..	1 vial, 2.5 ml
(7)	 Concentrado Cromogénico TMB	0,6 mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en <a href="#">una base orgánica</a>	1 vial, 12 ml
(8)	 Tampón del Sustrato	Tampón de ácido cítrico con 0,03% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	1 vial 12 ml
(9)	 Solución de Lavado Conc. (20x)	Tampón Fosfato con Tween-20.	1 vial, 58 ml
(10)	 Solución de Parada	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ácido sulfúrico)	1 vial 12 ml

**• OTROS MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS**




ITEMS	Componentes
(1)	Micropipetas y puntas de 5µl, 50µl and 100 µl
(2)	Incubadora o baño maría con control de temperatura a +37 ±1°C
(3)	Tubos para dilución de las muestras.
(4)	Equipo para lavado de placas.
(5)	Agua purificada: destilada o desionizada.
(6)	Lector de microplacas ELISA: Longitud de onda dual 450nm con longitud de onda de referencia de 620-690nm <sup>18</sup> , ancho de banda 10nm.
(7)	Un analizador EIA de microplacas totalmente automático es opcional. El usuario debe validar el equipo en conjunto con el kit.


#### 4.1) Condiciones de almacenaje y estabilidad del kit y sus componentes.

Kit/componentes	Condición de almacenaje	Estado	Estabilidad
KIT ELISA ANTI-HBc IgM	+2 a +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control positivo IgM Anti-HBc	+2 a +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control Negativo IgM Anti-HBc	+2 a +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Reactivo HBcAg	+2 a +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Diluyente de la Muestra	+2 a +8 °C	Original	16 meses
		Una vez abierto	1 mes
Placa IgM Anti-humano	+2 a +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	2 meses
Solución Conjugado Anti-HBc • Peroxidasa	+2 a +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Concentrada (20x)	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Diluida 20x	Temp ambiente	Diluido	2días
	+2 a +8 °C	Diluido	1 semana
TMB Cromogénico Concentrado	+2 a +8 °C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Tampón del sustrato	+2 a +8 °C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Parada	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes

### 5) INSTRUCCIONES DE USO

#### 5.1) Advertencias:

- 5.1.1) Este kit de reactivos es sólo para uso profesional.
- 5.1.2)  Este kit de reactivos es sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- 5.1.3) Procure que todos los reactivos del kit y las muestras alcancen temperatura ambiente (+20 to +30 °C) y mézclelos cuidadosamente antes de usar.
- 5.1.4) No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- 5.1.5) No intercambie reactivos entre lotes diferentes.
- 5.1.6) No pipetee con la boca.
- 5.1.7) No fume o coma en zonas donde se manipulan muestras o reactivos.
- 5.1.8) El control positivo, negativo, reactivo HBsAg, solución del conjugado y las muestras deben considerarse como peligros potenciales para la salud. Deben usarse y eliminarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio del usuario. Estos procedimientos de seguridad probablemente incluirán el uso guantes de protección y evitar la generación de aerosoles.
- 5.1.9) Las muestras potencialmente infecciosas y derrames o goteos que no contienen ácidos deben ser limpiados concienzudamente con hipoclorito de sodio al 5% o tratado de acuerdo con las prácticas del laboratorio para el control de un potencial riesgo biológico.
- 5.1.10) Antes de eliminar los desechos de las muestras usadas y reactivos del kit como desechos generales, estos deben ser tratados de acuerdo con el procedimiento local para desecho con potencial riesgo biológico o tratado como sigue:  
Tanto los desechos sólidos como los líquidos deben ser autoclavados a +121 °C por lo menos por 30 minutos.  
El desecho sólido también se puede incinerar.  
El desecho líquido no ácido puede tratarse con hipoclorito de sodio diluido a una concentración final de 1%.  
Los desechos ácidos deben ser neutralizados antes de tratarlos con hipoclorito de sodio como se mencionó antes y debe mantenerse por 30 minutos para obtener una desinfección efectiva.
- 5.1.11)  La solución de parada es irritante para los ojos, la piel, vías respiratorias y membranas mucosas. Evite el contacto de la solución de parada con la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lave con copiosa cantidad de agua inmediatamente. En caso de inhalación, proporcione aire fresco y busque ayuda médica en caso de molestias.
- 5.1.12)  El concentrado cromogénico TMB contiene **un disolvente orgánico** que es tóxico: peligro de efecto graves irreversibles por inhalación, contacto con la piel o ingestión. El concentrado cromogénico TMB contiene dimetil sulfóxido, un irritante para la piel y membranas mucosas.

- 5.1.13)  A pesar de que todo el material de origen humano ha resultado no reactivo para anti-VHC y Anti-VIH y ha sido inactivado a +56 °C por una hora, el reactivo debe manipularse como material potencialmente infeccioso.<sup>7</sup>

## 5.2) Riesgos residuales

- 5.2.1) Una operación incorrecta podría conducir a resultados incorrectos.
- 5.2.2) El uso del kit después de la fecha de caducidad puede dar lugar a resultados incorrectos.
- 5.2.3) La lavadora ineficiente y el lector ELISA podrían afectar el resultado final.
- 5.2.4) El almacenamiento a temperaturas más altas podría afectar la vida útil del producto.
- 5.2.5) El producto es para un solo uso. La reutilización podría conducir a resultados incorrectos.
- 5.2.6) Cualquier cambio en el procedimiento de prueba puede conducir a resultados incorrectos que podrían causar un error de diagnóstico.

## 5.3) Toma de Muestra y Preparación para el Análisis

- 5.3.1) El paciente no requiere preparación especial antes de la toma de la muestra. La sangre debe ser tomada con técnicas médicas aprobadas.
  - 5.3.2) Con este kit diagnóstico se puede usar suero o plasma. La muestra de sangre total debe separarse lo antes posible para evitar hemólisis. Cualquier partícula presente en la muestra (por ej. glóbulos rojos, coágulos de fibrina) deben eliminarse antes de usar.
  - 5.3.3) Las muestras deben almacenarse de +2 a +8 °C y evitar inactivación por calor para minimizar el deterioro. Para almacenar por periodos largos, las muestras se deben congelar por debajo de -20 °C. No se recomienda almacenarlas en congeladores que se auto descongelan.
  - 5.3.4) Las muestras congeladas deben ser descongeladas completamente y mezcladas en forma homogénea antes del ensayo.
  - 5.3.5) Evite congelar y descongelar en forma sucesiva
- 5.3.6) **ADVERTENCIA**
- 1. La muestra no debe tener ningún componente de AZIDA que inhibe la actividad de la peroxidasa
  - 2. Muestras de suero coaguladas y muestras con contaminación bacteriana no deben ser usadas

## 5.4) Almacenaje del kit

- 5.4.1) El kit debe almacenarse entre +2 y +8 °C. No congelar.
- 5.4.2) Las tiras de las placas deben usarse dentro de 2 meses después de abrir la bolsa original de aluminio. Las tiras no usadas deben permanecer en la bolsa de aluminio firmemente sellada.
- 5.4.3) Almacene los reactivos nuevamente entre +2 y +8 °C inmediatamente después de su uso.
- 5.4.4) El concentrado (x20) de la solución de lavado es almacenado y transportado entre +2 y +8 °C, lo que puede causar cristalización. Si hay precipitado de cristales antes del uso, caliente la solución en un baño maría a +37 °C hasta que los cristales se disuelvan.

## 5.5) Procedimiento de lavado de placas

- 5.5.1) Preparación de la solución de lavado:  
Diluya la solución de Lavado (x20) con agua destilada o desionizada a una dilución de 1:20. No use agua del grifo.
- 5.5.2) Lavado de las placas:
  - (a) Para un lavador de placas con función de aspiración de desborde: 6 ciclos de por lo menos 0,5 ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo
  - o
  - (b) Para un lavador sin la función de aspiración de desborde: 8 ciclos de por lo menos 0,35ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo.
- 5.5.3) Seque invirtiendo la placa sobre un papel absorbente y golpeándola enérgicamente. Si queda demasiado tampón de lavado residual, podría causar resultados falsos.



### ADVERTENCIA

Un lavado inadecuado causará resultados falsos.

## 5.6) Procedimiento del Ensayo

- 5.6.1) Asegúrese de que todos los reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente (+20 a +30 °C) antes del ensayo. Ajuste el baño maría o incubadora a +37±1 °C.
- 5.6.2) Haga una dilución de 1+100 para cada muestra:  
Prepare para cada muestra un tubo para dilución, excepto para los controles. Agregue 5000 µl de Diluyente de la Muestra y 5 µl de cada muestra al tubo respectivo, agite para mezclar.
  - a) No diluya los controles.
  - b) Use una punta nueva de pipeta para cada muestra para evitar contaminación cruzada.
- 5.6.3) Reserve un pocillo para el Blanco. Agregue 100 µl de Control Negativo a cada una de tres pocillos, 100 µl de Control Positivo a cada una de dos pocillos, 100 µl de Diluyente de la Muestra a cada una de los pocillos para las muestras.
- 5.6.4) Agregue 5 µl de cada muestra diluida a cada pocillo que ya contiene Diluyente de la Muestra.
- 5.6.5) Agite la placa suavemente.
- 5.6.6) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.
- 5.6.7) Incube la placa a +37 °C por 1 hora.
- 5.6.8) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo "5.4. PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS".
- 5.6.9) Agregue 50 µl de reactivo HBcAg a cada pocillo excepto el Blanco seguido por 50 µl de solución Anti-HBc-Peroxidasa. Coloque una nueva cubierta autoadhesiva.
- 5.6.10) Incube la placa a +37 ± 1°C °C por 1 hora.

- 5.6.11) Al finalizar el periodo de información, retire y elimine la cubierta autoadhesiva, lave la placa siguiendo "5.4. PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS".
- 5.6.12) Seleccione uno de los dos métodos siguientes para desarrollar el color:
- A. Mezcle volúmenes iguales de **concentrado cromogénico TMB y Tampón de sustrato** en un recipiente limpio inmediatamente antes de usar. Agregue **100 µl** de la solución de la mezcla a cada pocillo incluyendo el blanco.
- B. Agregue primero **50 µl** de **concentrado cromogénico TMB** y luego agregue **50 µl** de **Tampón del sustrato** a cada pocillo incluyendo el blanco. Mezcle suavemente.



**NOTA:** El concentrado cromogénico TMB debe ser entre incoloro y celeste; de otro modo debe ser eliminado. La mezcla de concentrado cromogénico TMB con tampón del sustrato debe usarse dentro de 30 minutos a partir del momento de la mezcla. La mezcla debe protegerse de la luz intensa.

- 5.6.13) Cubra la placa con la cubierta negra e incube a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 5.6.14) Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo el blanco.
- 5.6.15) Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 15 minutos con un fotómetro de precisión a 450 nm con una longitud de onda seleccionada de referencia de 620 a 690nm\*8. Use el blanco para blanquear el fotómetro.



**NOTA:** El color del blanco debe ser de incoloro a amarillento pálido; de otro modo el ensayo es inválido. En este caso el ensayo debe ser repetido. Blanco Sustrato: la absorbancia debe ser menor de 0,100.

### 5.7) Cálculo de los resultados del ensayo

- 5.7.1) Cálculo de la CNx (Absorbancia promedio del Control Negativo).

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0,068
2	0,072
3	0,070

$$CNx = (0,068 + 0,072 + 0,070) / 3 = 0,070$$



**NOTA:** CNx debe ser  $\leq 0,1$  de otro modo el ensayo es inválido.

- 5.7.2) Cálculo de CPx (Absorbancia Promedio del Control Positivo)

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	1,612
2	1,613

$$CPx = (1,612 + 1,613) / 2 = 1,613$$



**NOTA:** CPx debe ser  $\geq 0,4$  de otro modo el ensayo es inválido.

- 5.7.3) Cálculo del Valor P-N

$$P-N = CPx - CNx$$

Ejemplo:

$$P - N = 1,613 - 0,070 = 1,543$$



**NOTA:** El valor P - N debe ser  $\geq 0,3$  de otro modo el ensayo es inválido.

- 5.7.4) Cálculo del Valor de Corte

$$\text{Valor de Corte} = CNx + (CPx)/4$$

Ejemplo:

$$\text{Valor de Corte} = 0,070 + (1,613)/4 = 0,473$$

- 5.7.5) Cálculo del Rango de Repetición

$$\text{Rango de Repetición} = \text{Valor de Corte} \pm 10\%$$

Ejemplo: Valor de Corte = 0,473

$$\text{Rango de Repetición} = (0,473 - 0,047) \text{ a } (0,473 + 0,047) = 0,426 \text{ a } 0,520$$

### 5.8) Validez de los Ensayos

- 5.8.1) CNx debe ser  $\leq 0,1$  de otro modo el ensayo es inválido.
- 5.8.2) CPx debe ser  $\geq 0,4$  de otro modo el ensayo es inválido.
- 5.8.3) Valor de P-N debe ser  $\geq 0,3$  de otro modo el ensayo es inválido.

### 5.9) Interpretación de los Resultados

Las muestras con una relación señal/corte  $\leq 0,9$  se consideran no reactivas para IgM Anti-HBc. Las muestras con una relación señal/corte  $\geq 1,1$  se consideran reactivas para IgM Anti-HBc.

Si la relación señal/corte cae dentro del Rango de Repetición (0,9 - 1,1), el ensayo debe ser repetido en duplicado e interpretado como se ha indicado. Si ambos resultados son no reactivos el resultado final es no reactivo, si ambos resultados son reactivos, el resultado final es reactivo. Cualquier otra combinación constituye un resultado indeterminado. En caso de resultados indeterminados, debe considerarse el ensayo de muestras posteriores y otros marcadores serológicos de la hepatitis B.



**NOTA:**

Interpretación de Resultados: El resultado de un ensayo Anti-HBc IgM siempre debe ser interpretado tomando en cuenta tanto otros marcadores serológicos para hepatitis B y NAT como la sintomatología clínica.



### 5.10) Solución de Problemas

Si el resultando no puede ser reproducido, una solución preliminar debe proceder revisando las posibilidades listadas a continuación:

- 5.10.1) Procedimiento de lavado inadecuado.
- 5.10.2) Muestra contaminada con positivo.
- 5.10.3) Volumen de muestra, conjugado o sustrato equivocado.
- 5.10.4) Contaminación del borde del pocillo con conjugado.
- 5.10.5) Muestra inadecuada, p.ej. suero o plasma hemolizados, muestra con precipitado, muestra no suficientemente mezclada antes del uso.
- 5.10.6) Tiempo o temperatura de incubación equivocados.
- 5.10.7) Cabeza y agujas de la lavadora para dispensar/aspirar total o parcialmente obstruidas.
- 5.10.8) Aspiración insuficiente.

### 5.11) Limitaciones e Interferencias

- 5.11.1) Este kit de reactivos es para ser usado con muestras de suero o plasma humano individual. No puede ser usado en muestras de plasma o suero no humano.
- 5.11.2) El kit no ha sido validado para uso con muestras de cadáver.
- 5.11.3) Resultados falsos positivos no reproducibles pueden producirse en cualquier kit de inmunoensayo enzimático, principalmente debido a error técnico ya sea de parte del operador o funcionamiento defectuoso del aparato usado.
- 5.11.4) Cuando los resultados del ensayo IgM Anti-HBc se utilizan para diferenciar infecciones por VHB agudas de no agudas, deben tomarse en cuenta la historia clínica del paciente y los resultados de otros marcadores (si están disponibles).
- 5.11.5) Un resultado IgM Anti-HBc negativo no descarta la posibilidad de infecciones por VHB previas.
- 5.11.6) Sustancias que podrían interferir:  
Muestras que podrían interferir p. ej. muestras hiperlipémicas, hemolizadas, ictericas, con componentes de inmunoglobulinas monoclonales, con alta cantidad de anticuerpos autoinmunes (factor reumatoide-FR, anticuerpos anti nucleares- ANA, o anticuerpos anti mitocondrias- AMA) no afectaron el resultado del ensayo con el kit ELISA Anti-HBc IgM actual.
- 5.11.7) Los anticoagulantes heparina, EDTA y citrato de sodio, no influyen en la especificidad de ELISA IgM ANTI-HBc y se puede usar para obtener muestras de plasma para análisis con el kit IgM Anti-HBc IgM actual.

### 5.12) Características del Ensayo

#### 5.12.1) Especificidad Diagnostica

Características de la Sangre	No. De muestras	Resultado Negativo	
		Ensayo de Referencia	Ensayo de IgM ANTI-HBc
Pacientes clínicos/hospitalizados Pacientes (VHB negativos 'clínicos')	200	200	200
Donantes de sangre ('donantes' negativos para VHB/Anti-HBc)	200	198	200
Muestra con sustancias que podrían interferir	50	50	50
Total	450	448	450
Especificidad Diagnóstica	-----	99,5%	<b>100%</b>

#### 5.12.1.1) Sustancias que podrían interferir

Se investigaron posibles interferencias con el ensayo IgM Anti-HBc.

Por cada sustancia que podría interferir, se prepararon al menos dos muestras de suero conteniendo cantidades diferentes de la sustancia en cuestión se mezclaron en proporciones fijas de 10 + 0; 7 + 3; 5 + 5; 3 + 7; 0 + 10 con otras muestras de suero que contenían altos niveles de IgM Anti-HBc pero sin factores de interferencia. Se analizaron tanto las muestras sin diluir como las mezcladas.

El estudio de especificidad incluyó especialmente:

- Muestras lipémicas (turbias) antes y después de centrifugarlas a alta velocidad
- muestras hemolíticas o hemolizadas
- muestras ictericas (=hiperbilirrubinemia)
- Muestras con componentes de inmunoglobulinas monoclonales
- muestras con niveles altos de anticuerpos autoinmunes (factor reumatoide – FR, anticuerpos anti nucleares – ANA, anticuerpos anti mitocondria \_AMA)

No se detectó interferencia con ninguno de los dos lotes usados, el tipo de anticoagulante tampoco tuvo ninguna influencia sobre los dos lotes de ELISA ANTI-HBc IgM ensayados

#### 5.12.2) Sensibilidad Analítica y Linealidad:

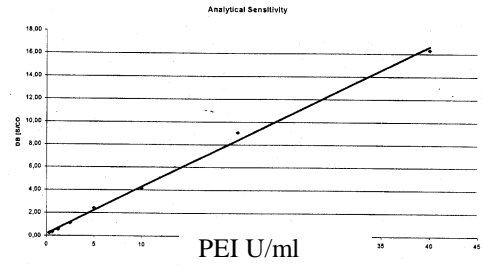
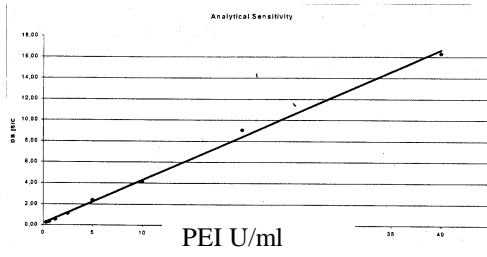
##### 5.12.2.1) Límite de detección usando la dilución de los Materiales de Referencia de IgM Anti-HBc:

Se usaron diluciones seriadas del Material Estándar del Paul Ehrlich Institute (PEI) (Langen, Germany) para IgM Anti-HBc (100 PEI U/ml) para evaluar la sensibilidad analítica (límite de detección) del ANTI-HBc IgM ELISA.

La sensibilidad analítica (límite de detección) fue definida como la concentración más baja que puede ser detectada. Ambos lotes de ANTI-HBc IgM ELISA tenían una sensibilidad analítica en 2,5 PEI U/ml, mejor que el ensayo de referencia por una dilución doble.

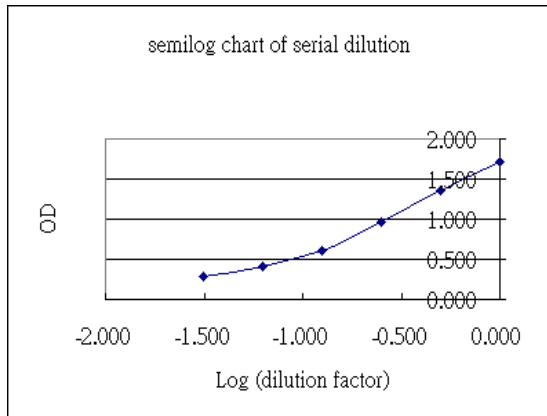
Sensibilidad Analítica del Lote No B44333PT  
S/C vs Concentración

Sensibilidad Analítica del Lote No B44334PT  
S/C vs Concentración



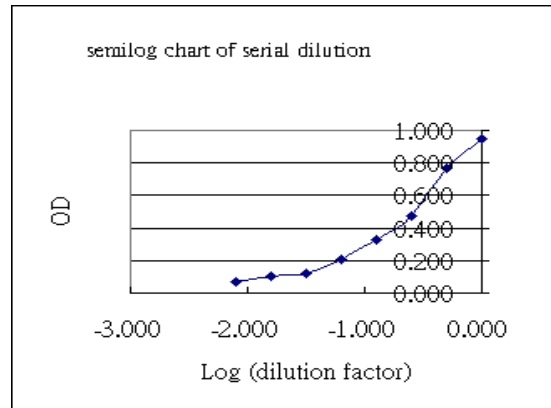
### 5.12.2.2) Linealidad usando muestras de sangre

La linealidad se evaluó con 2 lotes de ANTI-HBc IgM ELISA usando muestras de sueros positivos con alta concentración de IgM Anti-HBc después de diluirlas cubriendo todo el rango de medición y luego diluciones más seguidas alrededor del nivel de corte.



Rango Lineal: DO desde 1,714 hasta 0,290

Linealidad (gráfico semilog): R = 0,983



Rango Lineal: DO desde 0,95 hasta 0,118

Linealidad (gráfico semilog): R = 0,980

### 5.12.3) Sensibilidad Diagnóstica

Muestras positivas/Muestras usadas para evaluar la sensibilidad diagnóstica/ Pacientes con infección por VHB.

#### 5.12.3.1) Individuos infectados con VHB

Se analizaron 207 muestras IgM Anti-HBc positivas conocidas con ANTI-HBc IgM ELISA, donde 199 de estas 207 muestras fueron detectadas como positivas, 1 como negativa y 7 como indeterminadas.

La sensibilidad diagnóstica para ANTI-HBc IgM ELISA fue determinada en 96,1 % (199/207) y mejor que la sensibilidad del ensayo de referencia con la marca CE cuya sensibilidad diagnóstica fue determinada en 90,8 % (188/207), detectando 188 de las 207 muestras como positivas, 13 como negativas y 6 como indeterminadas.

Muestras	ANTI-HBc IgM	Ensayo de Referencia
positivo	199	188
negativo	1	13
indeterminado	7	6
total	207	207
Sensibilidad Diagnóstica calculada	96,1%	90,8%

#### 5.12.3.2) Paneles de seroconversión Comerciales

Se usaron ocho paneles de seroconversión disponibles en el comercio (de Boston Biomedica Inc., BBI; West Bridgewater, MA USA; Pyramid-Profile Diagnostics, Sherman Oaks, CA, USA y NABI, Boca Ratón, FL, USA), consistentes en muestras de seguimiento que fueron tomadas semanal o mensualmente de pacientes con hepatitis B aguda. Todos los paneles han sido caracterizados para marcadores serológicos específicos para VHB (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc-IgM, y HBsAg).

Al usar los paneles de seroconversión, el ANTI-HBc IgM ELISA DIAsource detectó IgM Anti-HBc cerca de 1 muestra antes en el Panel NABI RP-009 y el ensayo de referencia detectó IgM Anti-HBc dos muestras antes en el panel BBI 935<sup>a</sup> y una muestra antes en el panel NABI RP-017. En resumen no hubo una diferencia significativa entre el ensayo ANTI-HBc IgM ELISA y el ensayo de referencia.

### 5.12.4) Precisión

#### 5.12.4.1) Repetibilidad intra-ensayo

Para la determinación de la precisión intra ensayo (dentro del ensayo) se usaron el control positivo y dos sueros de pacientes con diferentes títulos de IgM Anti-HBc (levemente sobre el nivel de corte y un nivel medio) fueron analizados en 20 repeticiones en un ensayo único cada día por 3 días y las absorbancias y fueron medidas y registradas.

El Coeficiente de Variación (CV) promedio e interno para el control positivo y muestras de pacientes fue calculado.

ítem ensayado	Número de muestras	precisión
Control Positivo	N = 20	CV ≤ 17,31%
Suero de Paciente No 1	N = 20	CV ≤ 20,11%
Suero de Paciente No 2	N = 20	CV ≤ 13,53%

#### 5.12.4.2) Reproducibilidad entre ensayos

ítem ensayado	Número de muestras	precisión
Control Positivo	N = 60	CV ≤ 12,83%
Suero de Paciente No 1	N = 60	CV ≤ 12,00%
Suero de Paciente No 2	N = 60	CV ≤ 8,24%

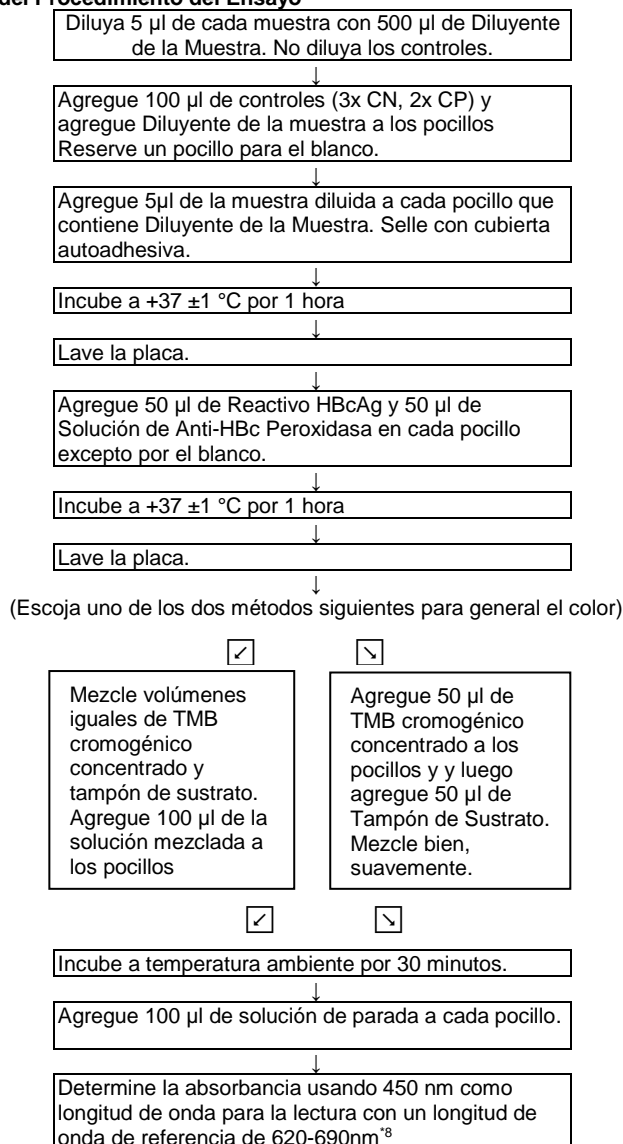
### 5.11.5) Seguimiento

Concentración del Control Positivo de ANTI-HBc IgM ELISA = 640 PEI U/ml ±30%

### 5.12.6) Exceso de Anticuerpo/Dosis alta Efecto de Gancho

Para comprobar el efecto de gancho por exceso de antígeno/dosis alta del ELISA IgM ANTI-HBc dos muestras de suero con un título muy alto de IgM Anti-HBc ( $DO_{490} \geq 1,5$ ) fueron analizadas en diluciones seriadas. No se observó ningún efecto de gancho por dosis alta/exceso de anticuerpo en ninguna de las dos muestras.

### 5.13) Diagrama de Flujo del Procedimiento del Ensayo



## 6) BIBLIOGRAFÍA

1. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF, Antibody to hepatitis B virus core in man. Lancet. 1973; 2(7834): 869-873.
2. Barker LF, Almeida JD, Hoofnagle JH, et al. Hepatitis B core antigen: immunology and electron microscopy. J Virol. 1974 Dec;14:1552-1558.
3. Hoofnagle JH., Gerety, R.J., Ni, LY., Barker, LF. Antibody to Hepatitis B core antigen: A sensitive Indicator of hepatitis B virus replication. New Engl J Med. 1974;290:1336-1340.
4. Niermeijer, P., Gips, C. H., Huizenga, J. R. et al. IgM Anti-HBc as a marker of persistent and IgG anti-HBc as a marker of past hepatitis B infection. A longitudinal study over 5 years. Acta Hepato-Gastroenterol 1978;25: 360–364.
5. Kryger P: Significance of anti-HBc IgM in the differential diagnosis of viral hepatitis. J Virol Meth. 1985; 10: 283-289.
6. Hadziyannis SJ, Hadziyannis AS, Dourakis S, et al. Clinical significance of quantitative anti-HBc IgM assay in acute and chronic VHB Infection. Hepatogastroenterology 1993;40:588–592.
7. Shikata T, Karasawa T, Abe K, et al. Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at +60°C for 10 hours, J. Infect. Dis. 1978;138:242-244.

### NOTAS:

\*8 La longitud de onda de referencia del espectrofotómetro puede ser de 620nm a 690nm. Sin embargo el usuario debe validar el foto metro en conjunto con este kit antes de su uso.

Fecha de la revisión: 2019-10-24