



CE
0344

Anti-HBc Total Elisa

KAPG4CBE3

History

Resume of change :

Previous Version :	Current Version :				
110627/2	191023/1				
<table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> 1N sulfuric acid	STOP	SOLN	<table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> 2N sulfuric acid	STOP	SOLN
STOP	SOLN				
STOP	SOLN				
/	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 Total Elisa

For qualitative detection of total antibody to hepatitis B virus core antigen
(anti-HBc Total) in human serum or plasma

en

KAPG4CBE3

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 90

1) INTENDED USE

ANTI-HBc Total ELISA is an enzyme immunoassay for in vitro qualitative detection of total antibody to hepatitis B virus core antigen (Anti-HBc Total) 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, antibody to HBcAg (Anti-HBc) is detectable in serum or plasma shortly before clinical symptoms and slightly after the appearance of HBsAg. In cases in which HBV infection resolves, anti-HBc appears in blood during the window period following loss of HBsAg and prior to the development of antibody to HBsAg (anti-HBs). Anti-HBc is found in acute and chronic hepatitis B patients and also indicates past resolved infection. Therefore, detection of anti-HBc is indicative of exposure to HBV and thus of infection by this virus. Further testing of HBV serological markers is required to define the specific disease state.¹⁻⁶

ANTI-HBc TOTAL ELISA is a fast test for the qualitative detection of the presence of antibodies to HBcAg in serum or plasma (heparin, citrate or EDTA) specimens. The test utilizes HBcAg on microtiter wells and human peroxidase-conjugated Anti-HBc in a competition principle to detect Anti-HBc levels in serum or plasma.

Specimens with absorbance values greater than 1.1 x Cutoff Value are considered **NEGATIVE** for Anti-HBc.

Specimens with absorbance values less than 0.9 x Cutoff Value are considered **POSITIVE** for Anti-HBc.

The test has to be repeated in duplicate for specimens with absorbance value within the retest range (Cutoff Value \pm 10 %) and interpreted as above. If the absorbance of any of the specimens retested in duplicate is still within the retest range, it is suggested to test follow-up samples of the patient.

3) TEST DESCRIPTION

ANTI-HBc TOTAL ELISA is a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA= enzyme-linked immune assay) - based on a competitive principle. The solid phase of the microtiter plate is made of polystyrene wells coated with HBcAg and the liquid phase of human peroxidase conjugated Anti-HBc. When a serum or plasma specimen containing Anti-HBc is added to the HBcAg-coated wells together with the human peroxidase conjugated Anti-HBc and incubated, a competition will take place for the binding to the HBcAg on the wells. (HBcAg)-(Anti-HBc • peroxidase) complex and/or (HBcAg)-(Anti-HBc) complex will form on the wells. After washing of the microtiter plate to remove unbound material, a solution of TMB substrate is added to the wells and incubated. Due to the competitive principle a color develops inversely proportional to the amount of Anti-HBc bound to HBcAg deriving from the 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 nm¹.

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

A Specimen containing Anti-HBc:


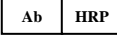


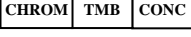
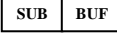

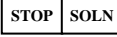
1. Plate well (HBcAg) + specimen (Anti-HBc) + Anti-HBc • peroxidase
→ Plate-HBcAg-Anti-HBc complex and Plate-HBcAg-Anti-HBc • peroxidase complex
2. + TMB substrate solution → blue to light to pale blue color/even colorless
3. Add sulfuric acid to stop the color development → Read OD at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm⁸.

B Specimen without Anti-HBc:

1. Plate well (HBcAg) + specimen (without Anti-HBc) + Anti-HBc • peroxidase
→ Plate-HBcAg-Anti-HBc-peroxidase complex
2. + TMB substrate solution → blue to light blue color
3. Add sulfuric acid to stop the color development, read OD at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690nm^{*1}.

4) DESCRIPTION OF MATERIALS PROVIDED

•Item 1 - 6 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)	 HBcAg Plate	Microtiter plate coated with HBcAg.	1 plate
(2)	 Anti-HBc · Peroxidase Solution	Anti-HBc (human) · peroxidase conjugate dissolved in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 8 ml
(3)	 Anti-HBc Positive Control	Anti-HBc positive serum in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 1.5 ml
(4)	 HB Negative Control	Serum non-reactive for HBV markers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 2.0 ml
(5)	 Chromogenic TMB concentrate	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base.	1 bottle, 12 ml
(6)	 Substrate buffer	Citrate Acid Buffer with Urea Hydrogen Peroxydase.	1 bottle, 12 ml
(7)	 Conc. Washing Solution (20x)	Concentrated phosphate buffer with Tween-20	1 bottle 58 ml
(8)	 Stop solution	2N H ₂ SO ₄ (Sulfuric Acid)	1 bottle 12 ml

• OTHER MATERIAL REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

ITEMS	Components
(1)	50µl, 100µl micropipettes and tips are needed
(2)	Incubator or waterbath with temperature control at +37 °C.
(3)	Plate washing equipment.
(4)	ELISA microwell reader: Dual wavelength 450nm with 620-690nm as reference wavelength ^{*1} , bandwidth 10nm.
(5)	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 TOTAL ELISA KIT	+2 to +8 °C	Original	18 months
		Once open	1 month
Anti-HBc Positive Control	+2 to +8 °C	Original	18 months
		Once open	1 month
HB Negative Control	+2 to +8 °C	Original	18 months
		Once open	1 month
HBcAg Plate	+2 to +8 °C	Original	24 months
		Once open	2 month
Anti-HBc · Peroxidase Conjugate Solution	+2 to +8 °C	Original	18 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) INSTRUCTIONS FOR USE

5.1) Warnings:

- 5.1.1) This reagent kit is for professional use only.
- 5.1.2) **IVD** 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, 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 nonacid 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 ⁷.

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) **WARNINGS**
1. The specimen must not contain any AZIDE compounds which can inhibit the peroxidase activity of the conjugate.
 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 the 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) Reserve 2 wells for blanks. Add 50µl of each control or specimen to appropriate wells of reaction plate (3 Negative Controls and 2 Positive Controls).



NOTE:

- a) Use a new pipette tip for each sampling to avoid cross-contamination
b) Each plate needs its own negative controls, positive controls and blank wells.
c) Do not use cut-off value established for other plates of ANTI-HBc TOTAL ELISA.
- 5.6.3) Add 50 µl of Anti-HBc- Peroxidase solution to each well except the 2 blanks.



NOTE: Do not touch the well wall for preventing contamination.

- 5.6.4) Gently tap the plate.
5.6.5) Remove the protective backing from the adhesive slip and press it onto the reaction plate, so that it is tightly sealed.
5.6.6) Incubate the reaction plate in a +37±1°C water bath or incubator for 1 hour.
5.6.7) At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive slip and wash the plate in accordance with 5.4) Plate washing procedure.
5.6.8) 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 2 blank wells.
B. Add 50 µl of Chromogenic TMB concentrate first, then add 50 µl of Substrate Buffer into each well including the 2 blanks.
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.

- 5.6.9) Cover the plate with black cover and incubate at room temperature for 15 minutes.
5.6.10) Stop the reaction by adding 100µl of stop solution to each well including the two blanks.
5.6.11) Determine the absorbance of controls and test specimens within 30 minutes with a precision photometer at 450 / 620-690 nm (450 nm reading wavelength with 620-690 nm reference wavelength)*¹. Use the first blank well to blank the photometer.



NOTE:

The blanks should be colorless to light yellowish in color; otherwise, the test results are 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	0.939
2	0.944
3	0.925

$$NCx = (0.939 + 0.944 + 0.925) / 3 = 0.936$$

NCx must be ≥ 0.4 , otherwise, the test run is invalid.

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

Example:

Sample No.	Absorbance
1	0.068
2	0.052

$$PCx = (0.068 + 0.052) / 2 = 0.060$$

PC x must be ≤ 0.1 , otherwise, the test run is invalid.

- 5.7.3) Calculation of the N - P Value

$$N - P = NCx - PCx$$

Example:

$$N - P = 0.936 - 0.060 = 0.876$$

N - P Value must be ≥ 0.3 , otherwise, the test run is invalid.

5.7.4) Calculation of the Cutoff Value

Cutoff Value = 0.4 NCx + 0.6 PCx

Example:

Cutoff Value = (0.4 x 0.936) + (0.6 x 0.060) = 0.410

5.7.5) Calculation of the Retest Range

Retest Range = Cutoff Value ± 10%

Example: Cutoff Value = 0.410

Retest Range = (0.410 - 0.041) to (0.410 + 0.041) = 0.369 to 0.451

5.8) Validity of Test Runs

5.8.1) **NC x must be ≥ 0.4 , otherwise, the test run is invalid.**

5.8.2) **PC x must be ≤ 0.1, otherwise, the test run is invalid.**

5.8.3) **N-P Value must be ≥ 0.3, otherwise, the test is invalid.**

5.9) Interpretation of Results

Specimens with absorbance values greater than 1.1 x Cutoff Value are considered NEGATIVE for Anti-HBc.

Specimens with absorbance values less than 0.9 x Cutoff Value are considered POSITIVE for Anti-HBc.

If the signal/cut-off ratio is within Retest Range (0.9-1.1 x cutoff), 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.

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 edge 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.

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 kit, largely due to technical error either on the part of the operator or malfunction of apparatus used.

5.11.4) Potential interfering substances:

Potential interfering samples, i.e. samples with hyperlipemia, hemolysis, hyper-bilirubinemia, and 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 ANTI-HBc TOTAL ELISA.

5.11.5) The anticoagulants heparin, EDTA and sodium citrate have no influence on the specificity of ANTI-HBc TOTAL ELISA and can be used to obtain plasma samples for analysis with the Anti-HBc Total kit.

5.12) Performance Characteristics

5.12.1) Diagnostic Specificity

Negative specimens/Specimens used to evaluate the specificity

True Negative Samples		ANTI-HBc TOTAL ELISA
Type of sample	Number of samples	No. negative samples
Blood donor samples	5020	5010
Samples from hospitalized persons	200	200
Samples contain potential interfering factors	97	97
Samples with added possible interfering factors	12	11
Samples with different anticoagulants	48	48
Total	5377	5366
Diagnostic Specificity	-----	5366/5377 = 99.8%

5.12.1.1) Potential interfering substances

Potential interferences with ANTI-HBc TOTAL ELISA (TMB) 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 Total levels but no interfering factors. The neat samples as well as the mixtures were analyzed.

In particular the specificity study included:

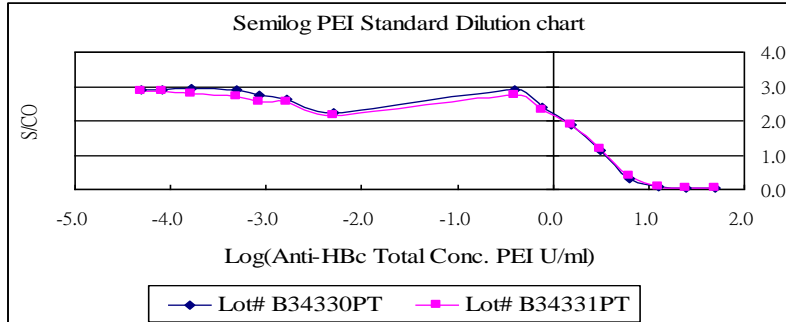
- lipemic (turbid) samples (hyperlipidemia) before and after high speed centrifugation

- hemolytic samples or hemolysate
- icteric samples (=hyperbilirubinemia)
- samples with monoclonal immunoglobulin components (hyperimmunoglobulinemia)
- samples containing elevated levels of autoimmune antibodies (rheumatoid factor - RF, antinuclear antibodies –ANA, or antimitochondrial antibodies-AMA).

No interferences were detected with both used lots. Neither the type of anticoagulant had an influence on both tested lots of ANTI-HBc TOTAL ELISA.

5.12.2) Analytical Sensitivity and Linearity:

To evaluate the sensitivity of ANTI-HBc TOTAL ELISA serial dilutions of the Standard Material for Anti-HBc Total of Paul Ehrlich Institute (PEI) (Langen, Germany) (100 PEI U/ml) were used.



For Lot# B34330PT: Linearity ,R=		-0.994	
For Lot# B34331PT: Linearity, R =		-0.991	
Worst Case: Linearity, R =		-0.991	
Lot#	A	B	
B34330PT	2.1397	-2.0009	
B34331PT	2.0757	-1.8801	
Lot#	X=(Y-A)B		
B34330PT	Detection Limit =	1.858	PEI U/ml
B34331PT	Detection Limit =	1.869	PEI U/ml
Worst Case	Detection Limit =	1.869	PEI U/ml

The analytical sensitivity (detection limit) was defined as the lowest concentration which can be detected, i.e. at $CO/S \geq 1.1$ (i.e. $S/CO \leq 0.9$) calculated by using the linear regression function.

5.12.3) Diagnostic Sensitivity

5.12.3.1) HBV infected individuals

435 HBV-positive samples were measured with both ANTI-HBc TOTAL ELISA and the reference assay. The diagnostic sensitivity for the DIAsource assay was 100% as it was for the reference assay.

5.12.3.2) Commercial seroconversion panels

Eight commercially available seroconversion panels consisting of follow-up samples which were collected at weekly or monthly intervals from patients suffering from acute hepatitis B, have been used. The panels were obtained from Boston Biomedica Inc., BBI; West Bridgewater, MA USA (PHM 933, PHM 934 and PHM 935A); Pyramid-Profile Diagnostics, Sherman Oaks, CA, USA (RP 009, RP 016 and RP 017) and NABI, Boca Roton, FL, USA (SB 411 and SB 413). All the panels have been characterized for HBV-specific serological markers (anti-HBs, anti-HBc IgM, anti-HBc-Total, and HBsAg).

By testing of the seroconversion panels ANTI-HBc TOTAL ELISA detected Anti-HBc Total one bleed earlier in the NABI panel RP-009 and the reference assay detected the Anti-HBc Total two bleeds earlier in the BBI Panel 935A and one bleed earlier in the NABI panel RP-017. In the other 5 panels, the ANTI-HBc TOTAL ELISA and the reference assay detected Anti-HBc Total in the same bleed.

In summary there was no significant difference between the DIAsource ANTI-HBc TOTAL ELISA assay and the reference assay.

5.12.4) Precision

5.12.4.1) Intra-run repeatability

For determination of intra-assay (within-run) precision, the Positive Control provided with the test kit and two patient serum samples with different Anti-HBc Total titer (slightly above the cutoff level and at medium level) were analyzed in replicates of 20 in a single "run" over 3 days. The CVs were in an acceptable range for both tested lots.

Item tested	Sample size	Precision
Positive Control	N = 20	CV ≤ 12.68%
Patient Serum #1	N = 20	CV ≤ 10.62%
Patient Serum #2	N = 20	CV ≤ 16.72%

5.12.4.2) Inter-run reproducibility

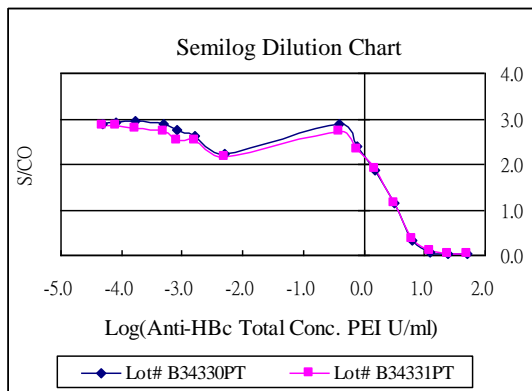
Item tested	Sample size	Precision
Positive Control	N = 60	CV ≤ 7.44%
Patient Serum #1	N = 60	CV ≤ 8.81%
Patient Serum #2	N = 60	CV ≤ 14.67%

5.12.5) Traceability

Concentration of Positive Control of ANTI-HBc TOTAL ELISA referred to the PEI Anti-HBc Total Reference Material = 70 PEI U/ml ± 30%

5.12.6) Antibody Excess/High-Dose Hook Effect

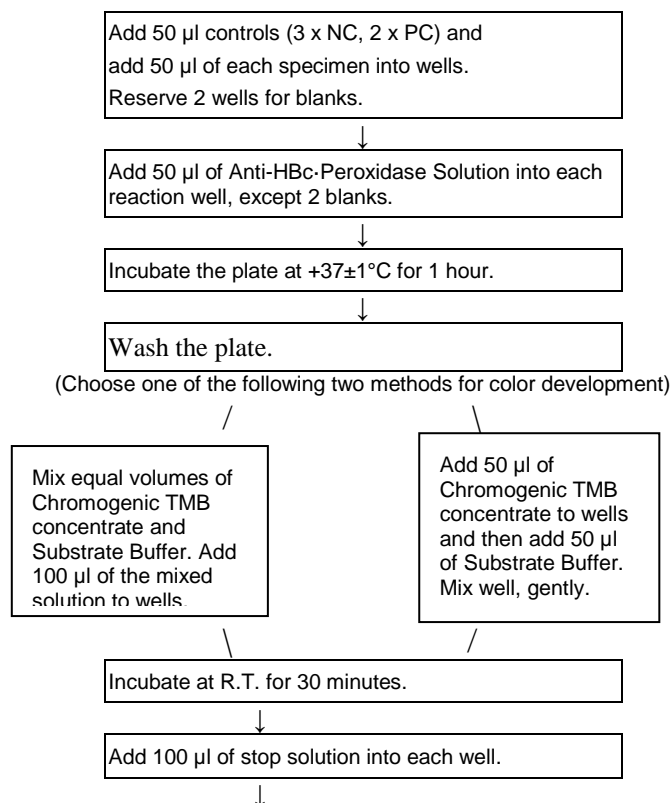
The effect of antibody excess was tested by consecutive dilution of a standard material having very high Anti-HBc levels (PEI Anti-HBc Total Reference Material).



The Semilog PEI Standard Dilution chart illustrates that an antigen/antibody excess is not occurring also because of the reverse reaction used in this assay format.

An antigen/antibody excess will not influence the reactive/non-reactive interpretation.

5.13) Flow Chart of Test Procedure



Determine absorbance using 450 nm as reading wavelength with 620-690nm reference wavelength⁸

6) BIBLIOGRAPHY

1. Aach RD, Grisham JW, Paker CW. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc Natl Acad Sci. USA 1971; 68:1056-1060.
2. Kim CY, Tikes JG. Purification and biophysical characterization of hepatitis antigen. J Clin Invest. 1973; 52:1176-1186.
3. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF, Antibody to hepatitis B virus core in man. Lancet. 1973; 2(7834): 869-873.
4. Barker LF, Almeida JD, Hoofnagle JH, et al. Hepatitis B core antigen: immunology and electron microscopy. J Virol. 1974 Dec;14:1552-1558.
5. Hoofnagle JH, Gerety, RJ., 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.
6. 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.
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 : 2019-10-23



Anti-HBc Total Elisa

es

Para la detección cualitativa del anticuerpo total contra el antígeno core del virus de la hepatitis B (anti-HBc Total) en suero o plasma humano

KAPG4CBE3

PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

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

ANTI-HBc TOTAL ELISA es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa in-vitro del anticuerpo total contra el antígeno core del virus de la hepatitis B (Anti-HBc Total) 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 con VHB, se puede detectar en el suero o plasma el anticuerpo contra HBcAg (Anti-HBc) un poco antes de que aparezcan los síntomas clínicos y un poco después de que aparezca HBsAg. En casos en los que la infección por VHB se resuelve, aparece anti-HBc en la sangre durante el periodo de ventana después que desaparece HBsAg y antes del desarrollo de un anticuerpo contra HBsAg (anti HBs). Anti -HBc aparece en pacientes con hepatitis B crónica y aguda. Y también es indicador de infecciones antiguas resueltas, por lo tanto la detección del anti-HBc demuestra que ha habido exposición a VHB y en consecuencia una infección por este virus. Se requieren más estudios de los marcadores serológicos de VHB para definir el estado específico de la enfermedad.*1-6

ANTI-HBc TOTAL 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 usa HBcAg en microplacas y Anti-HBc humano conjugado con peroxidasa en una prueba de competitividad para detectar los niveles de Anti-HBc en suero o plasma.

Las muestras con absorbancias mayores de 1,1 x Valor de Corte se consideran **NEGATIVAS** para Anti-HBc.

Las muestras con absorbancias mayores de 0,9 x Valor de Corte se consideran **POSITIVAS** para Anti-HBc.

El ensayo debe ser repetido en duplicado en las muestras cuyo valor de absorbancia cae dentro del rango de repetición (Valor de Corte \pm 10%) y ser interpretado cómo se ha indicado.

Si la absorbancia de cualquiera de las muestras repetidas en duplicado aún cae dentro del rango de repetición, se sugiere analizar muestras posteriores del paciente.

3) DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

ANTI-HBc TOTAL ELISA es un inmunoensayo enzimático de fase sólida (ELISA= *enzyme-linked immunosorbent assay*) – basado en un principio competitivo. La fase sólida de la microplaca está formada por pocillos de poliestireno recubiertos con HBcAg y la fase líquida del conjugado humano de Anti-HBc con peroxidasa. Cuando una muestra de suero o plasma que contiene Anti-HBc se agrega a los pocillos recubiertos con HBcAg junto con el Anti-HBc conjugado humano con peroxidasa y se incuban, se producirá competencia por la unión al HBcAg al complejo (HBcAg)-(Anti-HBc • peroxidasa) en los pocillos y/o el complejo (HBcAg)-(Anti-HBc) se formará 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. Debido al principio competitivo el color se desarrolla de manera inversamente proporcional a la cantidad de Anti-HBc unido a HBcAg que proviene de 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*8

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

A Muestra que contiene Anti-HBc






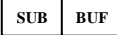
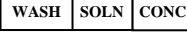
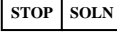
1. Placa (HBcAg) + muestra (Anti-HBc) + Anti-HBc • peroxidasa → Plate-HBcAg-Anti-HBc complejo y Plate-HBcAg-Anti-HBc • peroxidasa complejo
2. + solución de sustrato TMB → de azul a azul claro celeste/ incluso incoloro
3. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color → Lea la DO a 450nm con una longitud de onda de referencia seleccionada entre 620 y 690nm*8.

B Muestra sin Anti-HBc:

1. Placa (HBcAg) + muestra (sin Anti-HBc) + Anti-HBc • peroxidasa
→ Placa-HBcAg-Anti-HBc-peroxidasa complejo
2. + solución de sustrato TMB → color de azul celeste
3. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color → Lea la DO a 450nm con una longitud de onda de referencia seleccionada entre 620 y 690nm^{*8}.

4) DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS

● **Items 1 - 6 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)	 HBcAg Placa	Una microplaca recubiertos con HBcAg.	1 placa
(2)	 Solución Anti-HBc • Peroxidasa	Anti-HBc humano Conjugado Peroxidasa en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 8 ml
(3)	 Control Positivo Anti-HBc	Suero positivo para Anti-HBc en un tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 1,5 ml
(4)	 Control Negativo HB	Suero no reactivo para los marcadores de VHB. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 2.0 ml
(5)	 Concentrado Cromogénico TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en una base orgánica.	1 vial, 12 ml
(6)	 Tampón del Sustrato	Tampón de citrato acético con urea hidrógeno peroxidasa.	1 vial, 12 ml
(7)	 Solución de Lavado Conc. (20x)	Tampón concentrado de fosfato con Tween-20	1 vial 58ml
(8)	 Solución de Parada	1N H ₂ SO ₄ (ácido sulfúrico)	1 vial 12 ml

● OTROS MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

ITEMS	Componentes
(1)	Micropipetas y puntas de 50µl y 100 µl
(2)	Incubadora o baño maría con control de temperatura a +37 °C.
(3)	Equipo para lavado de placas.
(4)	Lector de microplacas ELISA: Longitud de onda dual 450nm con longitud de onda de referencia de 620-690nm ^{*1} , ancho de banda 10nm.
(5)	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
ANTI-HBc Total ELISA Kit	+2 to +8 °C	Original	18 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control positivo Anti-HBc	+2 to +8 °C	Original	18 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control Negativo HB	+2 to +8 °C	Original	18 meses
		Una vez abierto	1 mes
Placa HBcAg	+2 to +8 °C	Original	24 meses
		Una vez abierto	2 mes
Solución Conjugado Anti-HBc • Peroxidasa	+2 to +8 °C	Original	18 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	2 días
	+2 to +8 °C	Diluido	1 semana
TMB cromogénico concentrado	+2 to +8 °C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Tampón del sustrato	+2 to +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) **IVD** 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, 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 desechos 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 disolvente orgánico que es tóxico: peligro de efectos 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.*⁷

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 removerse 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 contener compuestos de azida que puedan inhibir la actividad de la peroxidasa en el conjugado.
 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 $+37\pm 1$ °C.
- 5.6.2) Reserve 2 pocillos para blancos. Agregue 50µl de cada control o muestra a los pocillos correspondientes en la placa donde ocurrirá la reacción (3 Controles Negativos y 2 Controles Positivos).



NOTA:

- a) Use una punta nueva de pipeta para cada muestra para evitar contaminación cruzada
- b) Cada placa necesita sus propios controles negativos, positivos y pocillos blancos.
- c) No use el valor de corte establecido para otras placas de ELISA ANTI-HBc TOTAL.
- 5.6.3) Agregue 50 µl de solución de anti-HBc• Peroxidasa a cada pocillo excepto a los 2 blancos.



NOTA: No toque la pared del pocillo para evitar contaminación.

- 5.6.4) Golpee la placa suavemente.
- 5.6.5) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.
- 5.6.6) Incube la placa a $+37\pm 1$ °C en baño maría o una incubadora por 1 hora.
- 5.6.7) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo "5.4. PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS".
- 5.6.8) 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 los 2 pocillos blancos.
- B. Agregue primero **50 µl de concentrado cromogénico TMB concentrado** 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.

- 5.6.9) Cubra la placa con la cubierta negra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 5.6.10) Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo los dos blancos.
- 5.6.11) Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 30 minutos con un fotómetro de precisión a 450 / 620-690 nm (Longitud de onda de 450 nm para la lectura con 620-690 nm de longitud de onda de referencia)*¹. Use el primer 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) Calculo de los resultados del ensayo

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

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.939
2	0.944
3	0.925

$$CNx = (0.939 + 0.944 + 0.925) / 3 = 0.936$$

CNx debe ser $\geq 0,4$ de otro modo el ensayo es inválido.

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

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.068
2	0.052

$$CPx = (0.068 + 0.052) / 2 = 0.060$$

CPx debe ser $\leq 0,1$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.7.3) Cálculo del **Valor N-P**

$$\mathbf{N-P = CNx - CPx}$$

Ejemplo:

$$N - P = 0.936 - 0.060 = 0.876$$

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

5.7.4) Cálculo del **Valor de Corte**

$$\mathbf{Valor de Corte = 0.4 CNx + 0.6 CPx}$$

Ejemplo:

$$\text{Valor de Corte} = (0.4 \times 0.936) + (0.6 \times 0.060) = 0.410$$

5.7.5) Cálculo del **Rango de Repetición**

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

Ejemplo: Valor de Corte = 0.410

$$\text{Rango de Repetición} = (0.410 - 0.041) \text{ a } (0.410 + 0.041) = 0.369 \text{ a } 0.451$$

5.8) Validez de los Ensayos

5.8.1) **CNx debe ser $\geq 0,4$ de otro modo el ensayo es inválido.**

5.8.2) **CPx debe ser $\leq 0,1$ de otro modo el ensayo es inválido.**

5.8.3) **Valor de N-P debe ser $\geq 0,3$ de otro modo el ensayo es inválido.**

5.9) Interpretación de los Resultados

Muestras con absorbancias mayores de 1,1 x Valor de Corte se consideran NEGATIVAS para Anti-HBc.

Muestras con absorbancias menores de 0,9 x Valor de Corte se consideran POSITIVAS para Anti-HBc.

Si la relación señal/corte cae dentro del Rango de Repetición (0,9 – 1,1 x corte), 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.

5.10) Solución de Problemas

Si el resultado no puede ser reproducido, una solución preliminar podría obtenerse revisando las posibilidades mencionadas 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.

5.11.2) El kit no ha sido validado par 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) 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 Anti-HBc Total ELISA actual.

5.11.5) Los anticoagulantes heparina, EDTA y citrato de sodio, no influyen en la especificidad de ANTI-HBc Total ELISA y se puede usar para obtener muestras de plasma para análisis con el kit Anti-HBc Total actual.

5.12) Características del Ensayo

5.12.1) Especificidad Diagnostica

Muestras negativas/Muestras usadas para evaluar la especificidad

Muestras Negativas Verdaderas		ANTI-HBc TOTAL ELISA
Tipo de muestra	Número de muestras	Nº. Muestras negativas
Muestras de donantes de Sangre	5020	5010
Muestras de personas hospitalizadas	200	200
Muestras que contienen factores que pudieran producir interferencia	97	97
Muestra con factores agregados que pudieran producir interferencia	12	11
Muestras con diferentes anticoagulantes	48	48
Total	5377	5366
Especificidad Diagnóstica	-----	5366/5377 = 99.8%

5.12.1.1) Sustancias que podrían interferir

Se investigaron posibles interferencias con el ensayo Anti-HBc Total ELISA.

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 Anti-HBc Total pero sin factores de interferencia. Se analizaron tanto las muestras sin diluir como las mezcladas.

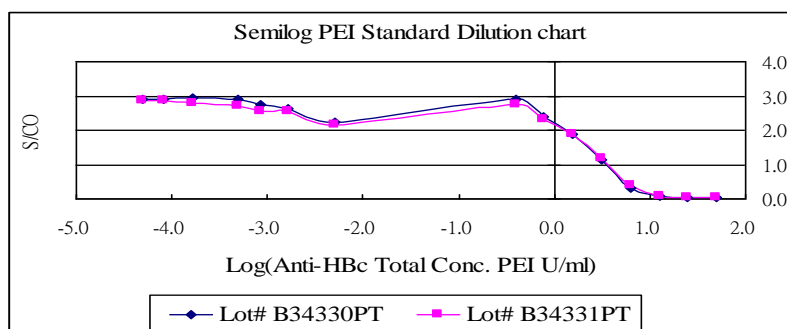
El estudio de especificidad incluyó especialmente:

- Muestras lipémicas (turbias) antes y después de centrifugarlas a alta velocidad
- muestras hemolíticas o hemolizadas
- muestras ictericas (=hiperbilirrubinemia)
- muestras con componentes de inmunoglobulinas monoclonales (hiperimmunoglobulinemia)
- 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 ANTI-HBc Total ELISA ensayados

5.12.2) Sensibilidad Analítica y Linealidad:

Para evaluar la sensibilidad de ELISA ANTI-HBc TOTAL se usaron diluciones seriadas del Material Estándar o Anti-HBc Total del Paul Ehrlich Institute (PEI) (Langen, Germany) (100 PEI U/ml).



Para Lote No B34330PT: Linealidad ,R=	-0.994
Para Lote No B34331PT: Linealidad ,R=	-0.991
Peor Caso: Linealidad, R =	-0.991
Lote No	A
	B

B34330PT	2.1397	-2.0009	
B34331PT	2.0757	-1.8801	
Lote No	X=(Y-A)B		
B34330PT	límite de detección =	1.858	PEI U/ml
B34331PT	límite de detección =	1.869	PEI U/ml
Peor Caso	límite de detección =	1.869	PEI U/ml

La sensibilidad analítica (límite de detección) fue definida como la concentración más baja que puede ser detectada, es decir en $CO/S \geq 1,1$ (es decir. $S/CO \leq 0,9$) calculada usando la función de regresión lineal.

5.12.3) Sensibilidad Diagnóstica

5.12.3.1) Individuos infectados con VHB

435 muestras VHB-positivas fueron analizadas con el ELISA ANTI-HBc TOTAL y el ensayo de referencia. La sensibilidad diagnóstica para el ensayo de DIAsource fue de 100% igual que para el ensayo de referencia..

5.12.3.2) Paneles de seroconversión Comerciales

Se usaron ocho paneles de seroconversión disponibles en el comercio consistentes en muestras de seguimiento que fueron tomadas semanal o mensualmente de pacientes con hepatitis B aguda. Los paneles se obtuvieron de Boston Biomedica Inc., BBI; West Bridgewater, MA USA (PHM 933, PHM 934 y PHM 935A); Pyramid-Profile Diagnostics, Sherman Oaks, CA, USA (RP 009, RP 016 y RP 017) y NABI, Boca Roton, FL, USA (SB 411 and SB 413). Todos los paneles han sido caracterizados para marcadores serológicos específicos para VHB (anti-HBs, anti-HBc total, anti-HBc-IgM, y HBsAg).

Al usar los paneles de seroconversión, ANTI-HBc TOTAL ELISA detectó Anti-HBc Total 1 muestra antes en el Panel NABI RP-009 y el ensayo de referencia detectó HBc Total dos muestras antes en el panel BBI 935^a y una muestra antes en el panel NABI RP-017. En los otros 5 paneles, el ELISA ANTI-HBc TOTAL y el ensayo de referencia detectaron Anti-HBc Total en la misma muestra.

En resumen no hubo una diferencia significativa entre el ensayo DIAsource ANTI-HBc TOTAL 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 Anti-HBc total (levemente sobre el nivel de corte y un nivel medio) fueron analizados en repeticiones de 20 en un ensayo único cada día por 3 días. Los CV cayeron dentro de un rango aceptable para ambos lotes analizados.

ítem ensayado	Número de muestras	precisión
Control Positivo	N = 20	CV ≤ 12.68%
Suero de Paciente No 1	N = 20	CV ≤ 10.62%
Suero de Paciente No 2	N = 20	CV ≤ 16.72%

5.12.4.2) Reproducibilidad entre ensayos

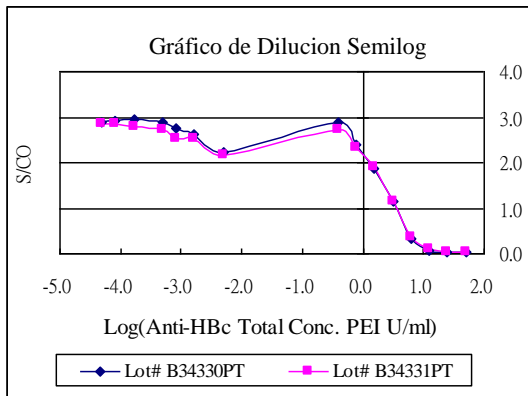
ítem ensayado	Número de muestras	precisión
Control Positivo	N = 60	CV ≤ 7.44%
Suero de Paciente No 1	N = 60	CV ≤ 8.81%
Suero de Paciente No 2	N = 60	CV ≤ 14.67%

5.12.5) Seguimiento

Concentración del Control Positivo de ANTI-HBc TOTAL ELISA en relación al Material de Referencia PEI Anti-HBc Total = 70 PEI U/ml ± 30%

5.12.6) Exceso de Anticuerpo/Dosis alta Efecto de Gancho

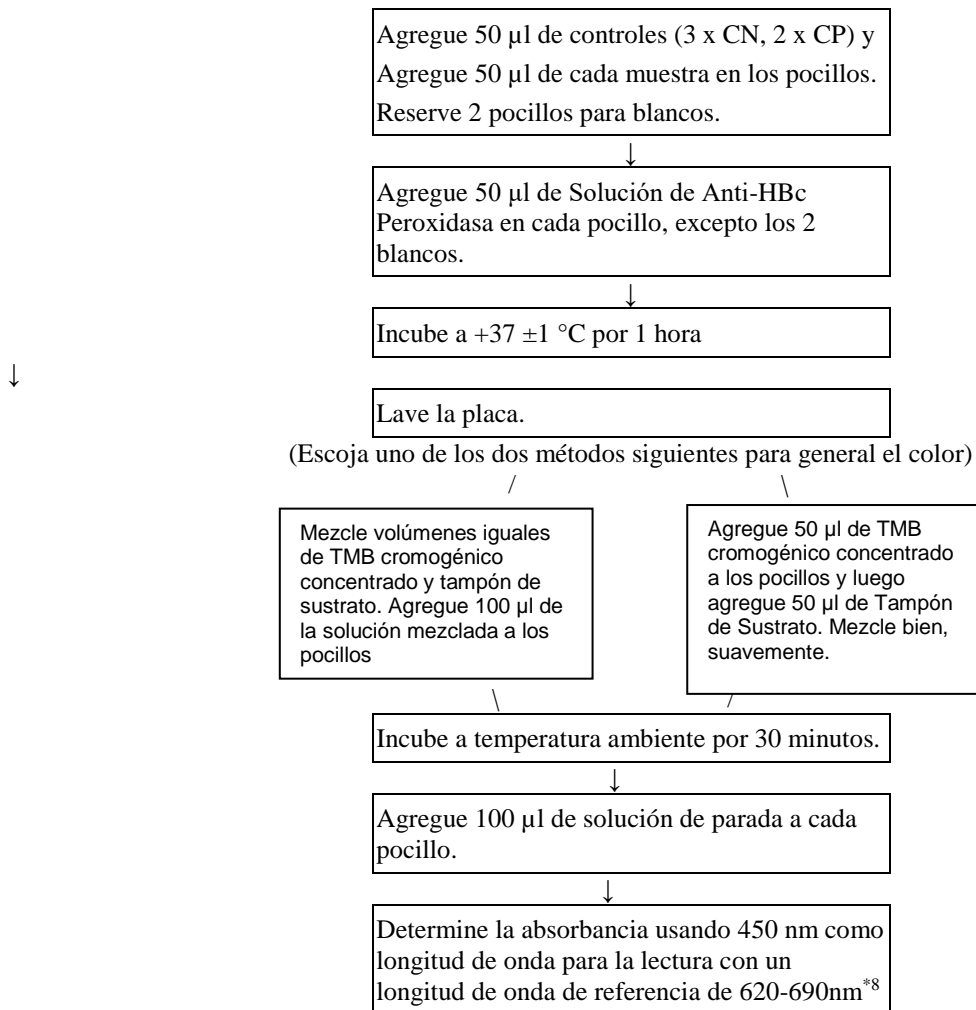
El efecto de un exceso de anticuerpos fue analizado en diluciones consecutivas de un material estándar con altos niveles de Anti-HBc (Material de Referencia Anti-HBc Total PEI)



El gráfico Semi logarítmico de la dilución del PEI estándar ilustra que un exceso de antígeno/anticuerpo no está ocurriendo, debido además a la reacción reversa usada en el formato de este ensayo.

Un exceso de antígeno/anticuerpo no influenciará la interpretación reactiva/no reactiva.

5.13) Diagrama de Flujo del Procedimiento del Ensayo



6) BIBLIOGRAFÍA

1. Aach RD, Grisham JW, Paker CW. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc Natl Acad Sci. USA 1971; 68:1056-1060.
2. Kim CY, Tikes JG. Purification and biophysical characterization of hepatitis antigen. J Clin Invest. 1973; 52:1176-1186.
3. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF, Antibody to hepatitis B virus core in man. Lancet. 1973; 2(7834): 869-873.
4. Barker LF, Almeida JD, Hoofnagle JH, et al. Hepatitis B core antigen: immunology and electron microscopy. J Virol. 1974 Dec;14:1552-1558.
5. Hoofnagle. JH. Gerety, RJ.. 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.
6. 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.
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: 2019-10-23