INTERÉS CLÍNICO

La infección con el virus de la hepatitis B se acompaña de la aparición en el suero de diferentes marcadores, uno de los más importantes son los anticuerpos dirigidos contra su antígeno Core (anti-HBcAg) que pueden detectarse durante el curso de la infección viral. Este constituye un indicador de la fase inicial de la infección aguda, además de ser un marcador perdurable que orienta tanto sobre un contacto anterior con el virus, como sobre la infección activa en período agudo - crónico (1-5).
La importancia de la detección de anti-HBcAg en suero, está sustentada por los siguientes aspectos:
1- Son los primeros anticuerpos que aparecen en la infección aguda (5).
2- Es el único marcador de la hepatitis B en el período de ventana inmunológica, en el que existen niveles muy bajos de su antígeno de superficie y los anticuerpos dirigidos contra este (anti-HBsAg) todavía no aparecen.
3- Determinan la exposición previa al virus de la hepatitis B.
4- Se utiliza en el pesquisaje antes de una vacunación.
5- Constituye un diagnóstico útil en las investigaciones epidemiológicas, por perdurar durante un tiempo más largo que otros marcadores (6-9).
El UMELISA ANTI-HBc debe ser utilizado con el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA), adecuado para efectuar la prueba en óptimas condiciones y garantizando el empleo del equipamiento necesario.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA ANTI-HBc es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo, en el cual se utiliza como fase sólida tiras de ultramicroelisa revestidas con el antígeno Core del virus de la hepatitis B obtenido por vía recombinante.
Las muestras se incuban en los pocillos de las tiras y el antígeno será bloqueado parcial o totalmente por los anticuerpos si estos están presentes. A continuación, previo lavado que elimina los componentes no fijados de la muestra, se añade un anticuerpo anti-HBcAg de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Después de una segunda incubación en presencia del conjugado, éste se fija a cualquier traza de antígeno remanente en el pocillo que no haya sido combinado en el paso anterior.
Un nuevo lavado eliminará el conjugado en exceso. Al añadir el sustrato fluorigénico (4-Metilumbeliferil fosfato), este será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida será inversamente proporcional a la presencia de anti-HBcAg en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO
Código UM 2029 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Solución Estabilizadora	1 x 15 mL
R3: Control Negativo	1 x 1 mL
R4: Control Positivo	1 x 0,5 mL
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 Ml

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.
Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.
Los Controles Negativo y Positivo, fueron negativos a las pruebas de detección de HBsAg, anti-VIH 1+2, anti-VHC y Sífilis. El Control Negativo fue no reactivoo, además, a las pruebas de detección de anti-HBcAg.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.
R2: Listo para el uso
R3: Listo para el uso
R4: Listo para el uso
R5: Listo para el uso.
R6: Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 ºC. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.
Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.
Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses de 2 a 8 ºC en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Papel absorbente.
- Incubadora de 37 ± 1 °C.

PRECAUCIONES

- Manipule las muestras, y los controles como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que se han puesto en contacto directo con las muestras y reactivos como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza indicados en los manuales de usuario correspondientes.
- Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y las muestras.
- Los sueros a utilizar deben ser preferentemente frescos, sin precipitados. Evite la congelación y descongelación reiterada de los mismos.
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.
- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
- Si utiliza la multipipeta ERIZO para transferir las muestras y los controles, debe lavar profusamente sus puntas para evitar la contaminación, al menos un lavado de cinco ciclos con solución de trabajo R1 y un lavado de cinco ciclos con agua destilada. Deseche la solución y el agua destilada después de cada lavado.
- Siga cuidadosamente las instrucciones de utilización del equipo de lavado. Los lavados incompletos influyen negativamente en el resultado del ensayo.
- Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.
- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
- Los reactivos del UMELISA ANTI-HBc de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.- Preparación de las muestras y los controles

1.I- Los controles se presentan en el estuche listos para usar.

1.II- En una cubeta de dilución, distribuya 10 μL de la solución estabilizadora (R2) y posteriormente añada 30 μL de cada muestra a analizar. La solución estabilizadora (R2) puede contener cierto material insoluble, pero ello no afecta los resultados de la prueba.
Homogeneice y proceda a adicionar la mezcla a las tiras de reacción, según se describe a continuación.

2.- Adición de las muestras y los controles a las tiras de reacción.

Coloque 10 μL de los controles y de la mezcla R2 - muestra, (descrita en el acápite **1.II** del Procedimiento Técnico) sobre los pocillos de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	P	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	N	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	N	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

El Control Positivo (P) y el Control Negativo (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. De utilizarse con este fin el programa UMELISA ANTI-HBc para la interpretación automática de los resultados, la distribución de las muestras debe realizarse manteniendo el esquema descrito; en las posiciones 1 y 2 coloque la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.- Incubación de las muestras y controles.
Incube las tiras de reacción una hora a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura

4.- Lavado.
Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción seis veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.- Adición del conjugado.
Con una **punta** nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras de reacción utilizadas y depositelos en un recipiente limpio.
Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

6.- Incubación del conjugado.
Incube las tiras de reacción una hora a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7.- Lavado.
Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8.- Adición del sustrato.
Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo.

9.- Incubación del sustrato.
Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25 ºC).

10.- Lectura.
Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de los resultados y su impresión son realizadas automáticamente por el programa UMELISA ANTI-HBc o pueden calcularse manualmente de acuerdo a las instrucciones que se describen a continuación.

CONTROL DE CALIDAD

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

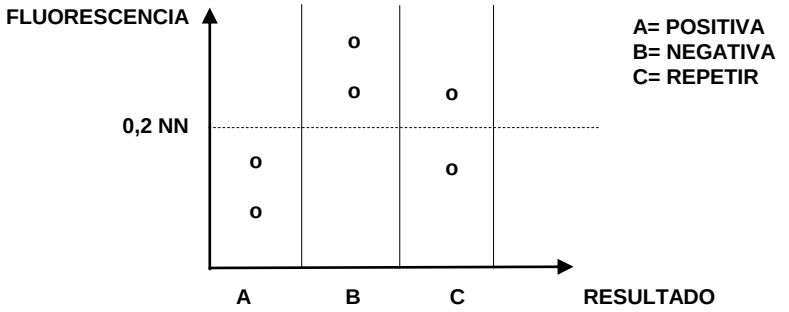
1- Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (P1 o P2) debe estar en un rango de 1 a 15 unidades de fluorescencia.
2- Al menos dos de los duplicados del Control Negativo deben tener valores entre 60 y 180 unidades de fluorescencia.
3- NN/PP $>$ 10
NN = Mediana de los duplicados del Control Negativo que se encuentren dentro de los límites de calidad.
PP =Valor de Control Positivo aceptado.

NIVEL DE CORTE

El valor de corte es 0,2 NN.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I - Muestras analizadas por duplicado.
La interpretación de los resultados se hará según el siguiente diagrama:

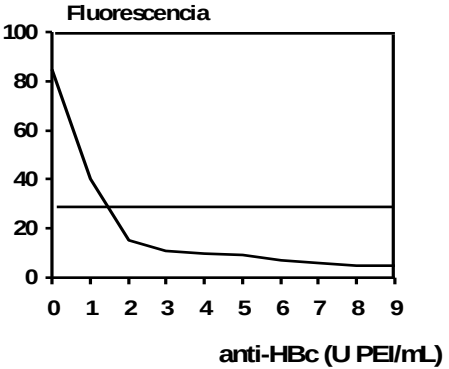


II- Muestras analizadas de forma simple:
Las muestras con valores de fluorescencia inferiores o iguales a 0,2 NN se consideran positivas. Muestras con resultados superiores se consideran negativas.

Un resultado **repetidamente POSITIVO** indica que la muestra contiene anti-HBcAg.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

1. DETECTABILIDAD.
Se realizó el estudio con una preparación estándar de anti-HBcAg procedente del Instituto Paul Ehrlich (Alemania). La detectabilidad del estuche Anti-HBcAg es de 1,5 UPEI/mL.



2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.
Se evaluó un panel de 246 muestras procedentes de donantes de sangre clasificadas por otras técnicas inmunoenzimáticas y se calculó la sensibilidad y especificidad para este ensayo.

Sensibilidad y Especificidad del UMELISA ANTI-HBc

Número de muestras	VP	FN	VN	FP	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
246	55	0	189	2	100	99,1

VP: Verdaderos Positivos **FN:** Falsos Negativos
VN: Verdaderos Negativos **FP:** Falsos Positivos

3. PRECISIÓN.

La reproducibilidad del ensayo fue determinada utilizando tres muestras y el Control Positivo y Negativo del estuche en replicados de seis, en tres ensayos consecutivos durante tres días, utilizando el mismo lote de material. Se calculó el coeficiente de variación (CV) intra e interensayo.

Precisión del UMELISA ANTI-HBc

Muestras	Intraensayo (n=10)		Interensayo (n=30)	
	FL	CV (%)	FL	CV (%)
P	9,45	9,1	8.95	10,1
N	141,3	4,3	139,7	5,6
M1	14,5	8,7	13,2	9,5
M2	27,5	6,7	28,7	7,8
M3	52,3	4,5	50,5	5,6

FL: Unidades de fluorescencia. **CV:** Coeficiente de Variación.

BIBLIOGRAFÍA

1-Blumberg, B.S.et al.: A serum antigen (Australian antigen) in Down's Syndrome, leukemia, and hepatitis. Ann. Intern. Med.66:924, 1967.

2-Benhamov, J.P.: Viral Hepatitis an overview (A,B,C,D,E). En: Viral Hepatitis Management. Standards for the future. Abstract & Posters. Cannes, 1992. p.6.

3-Perrillo, R.P.: Hepatitis B: Transmission and Natural History. En: Viral Hepatitis Management. Standards for the future. Abstract & Posters. Cannes, 1992. p.15.

4-Chang, M.H.et al.: Hepatitis B virus integration in hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma in childhood. Hepatology. 13:316, 1991.

5-Trepo, C.: Diagnostic Markers of Viral Hepatitis B and C. En: Viral Hepatitis Management. Standards for the future. Abstract & Posters. Cannes, 1992. p.21.

6-Margolis, H.S.et al.: Hepatitis B: Evolving epidemiology and implications for control. Sem. Liver Dis. 11:84-92, 1991.

7-Alter, M.J.et al.: Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. JAMA 262:1201, 1989.

8-Ko, Y.C. et al.: Horizontal transmission of hepatitis B virus from siblings and intramuscular infection among preschool children in a familiar cohort. Am.J.Epidemiol. 133:1015, 1991.

9-Piot, P. et al.: Hepatitis B: transmission by sexual contact and needle sharing. Vaccine. 8:837, 1990

Marzo 16, 2004.

UMELISA ANTI-HBc

Código UM 2029.

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA. Teléfono: 208-2929, Fax: (537) 208-6514.