



# Hepatitis B (anti-HBc)

*ELISA*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos contra o antígeno core do vírus da hepatite B (anti-HBc)

## SIGNIFICADO CLÍNICO

A hepatite B é uma doença viral caracterizada por um período prolongado de incubação (45-160 dias). O vírus causador desta patologia (HBV) é uma partícula composta por uma região interior o "core" onde se encontra o DNA e uma envoltura exterior antigênica conhecida como antígeno de superfície (HbsAg). Sua presença no soro indica enfermidade ativa.

O antígeno "core" (HbcAg) normalmente não é detectado em soro, porém seu anticorpo (anti-HBc) apresenta-se entre 10 à 25 dias posteriores à aparição do HbsAg, persistindo até depois do desaparecimento deste último antígeno e antes da aparição de seu anticorpo (anti-HBs). Portanto na ausência do HbsAg e anti-HBs, o anti-HBc é o único marcador sorológico de infecção recente pelo vírus da hepatite B. Por outro lado, visto que este anticorpo permanece detectável no soro por um longo período após a infecção, uma infecção crônica pode ser detectada.

## FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A amostra é colocada em contato com o antígeno HBcAg imobilizado sobre o suporte sólido na presença do anticorpo anti-HBc conjugado com peroxidase. Na presença de anticorpos específicos na amostra, estes competirão com o conjugado pelo antígeno presente no suporte.

Depois que incubar e lavar para eliminar a fração não unida, acrescenta-se o substrato enzimático.

Quanto maior a quantidade de anti-HBc presente na amostra, menor será o desenvolvimento da cor.

## REAGENTES FORNECIDOS

**Policubeta sensibilizada:** tiras removíveis com cavidades que contém HBcAg recombinante imobilizados.

**Conjugado:** anticorpo anti-HBc conjugado com peroxidase.

**Revelador A:** peróxido de hidrogênio 60 mmol/l em tampão citrato 50 mmol/l pH 3,2.

**Revelador B:** tetrametilbenzidina (TMB) 0,01 mol/l em ácido clorídrico 0,1 N.

**Stopper:** ácido sulfúrico 2 N.

**Tampão de lavagem concentrado:** cloreto de sódio 1,4 mmol/l em tampão fosfatos 100 mmol/l e tensoativo não iônico 0,1 g/l.

**Controle Positivo:** diluição de soro reagente para anticorpos anti-HBc inativado

**Controle Negativo:** diluição de soro não reativo, inativado.

## INSTRUÇÕES PARA USO

**Tampão de Lavagem:** sob baixa temperatura, os componentes do reagente podem precipitar. Neste caso, colocar

em banho-maria a 37°C alguns minutos, misturando depois por inversão. Para usar, diluir 1 + 4 com água destilada (1 parte de Tampão de Lavagem concentrado + 4 partes de água destilada).

**Policubeta Sensibilizada:** pronta para uso.

**Conjugado:** pronto para uso.

**Revelador A:** pronto para uso.

**Revelador B:** pronto para uso.

**Stopper:** pronto para uso.

**Controle Positivo e Controle Negativo:** prontos para uso.

## PRECAUÇÕES

- Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como potencialmente infectantes. Os controles encontram-se inativados. No entanto, devem ser usados como se tratando de material infectante.

- Os soros controles foram testados para (HIV) encontrando-se negativos.

- Todos os materiais empregados no ensaio devem ser destruídos a fim de assegurar a inativação dos agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é autoclavar durante 1 hora a 121°C. Os líquidos de dejetos podem ser desinfetados com hipoclorito de sódio (concentração final 5%) durante no mínimo 60 minutos.

- Não misturar reagentes de diferentes kits e lotes.

- Não usar reagentes de outra origem.

- As policubetas devem ser incubadas em estufa. Não usar banho-maria. Deve-se evitar abrir a estufa durante este processo.

- Evitar que os vapores de hipoclorito, provenientes dos recipientes para dejetos biológicos entrem em contato com a policubeta, já que o hipoclorito afeta a reação.

- Os reagentes são para uso "in vitro".

- Evitar o contato do ácido sulfúrico (Stopper) com a pele e mucosas. R36/38: irrita os olhos e a pele. R34: provoca queimaduras. S24/25: evitar o contato com os olhos e a pele. S26: caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com abundante água e acudir ao médico. S28: caso de contato com a pele, lavar imediatamente com abundante água. S37/39: utilizar luvas adequadas e proteção apropriadas para os olhos/cara.

- Evitar derramar os líquidos e a formação de aerossóis.

## ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

**Reagentes Fornecidos:** são estáveis sob refrigeração em temperatura entre 2-10°C até a data do vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

**Tampão de Lavagem:** é estável 3 meses a temperatura ambiente.

**Policubeta sensibilizada:** as tiras de cavidades com antígeno imobilizado (policubetas) são fornecidas fechadas à vácuo e com dessecante. Não abrir a embalagem até o momento de uso nem antes que esteja a temperatura ambiente, pois do contrário se favorecerá a umidade do conteúdo. As tiras de cubetas não utilizadas devem ser conservadas na embalagem com o dessecante, fechada com a fita auto-adesiva e a 2-10°C. As tiras conservadas nestas condições podem ser utilizadas nos 5 meses posteriores, desde que não se ultrapasse a data do vencimento do kit.

## AMOSTRAS

Soro ou plasma

**a) Coleta:** obter a amostra de maneira usual.

**b) Aditivos:** ao empregar plasma, poderá ser utilizado qualquer anticoagulante de uso corrente na prática transfusional.

**c) Substâncias conhecidas que interferem:** a hemólise, hiperlipemia e outras causas de turbidez podem provocar resultados errados. Estas amostras devem ser clarificadas por centrifugação.

**d) Estabilidade e instruções de armazenamento:** as amostras podem ser conservadas durante 7 dias em temperatura de 2-10°C. Para conservação por períodos prolongados, as amostras devem ser congelados a (-20°C) ou temperaturas menores. Evitar os congelamentos e descongelamentos repetidos. Existem evidências que mostram que os congelamentos sucessivos podem ser a causa de resultados errôneos. Se as amostras precisarem ser transportadas, embalar de acordo com a legislação sanitária vigente.

## MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipetas para medir os volumes indicados
- Relógio, alarme ou cronômetro
- Estufa a 37°C
- Material volumétrico adequado
- Espectrofotômetro para leitura de policubetas

## CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda primária: 450 nm
- Comprimento de onda secundária (leitura bicromática): 620-650 nm
- Calibração do Instrumento: zerar o espectrofotômetro com Branco de Reagente processado da mesma forma que uma determinação, mas omitindo a colocação da amostra e conjugado, ou seja, somente adicionar o Revelador A, Revelador B e Stopper.
- Volume da Amostra: 100 ul
- Tempo de Reação: 2 horas e 30 minutos
- Temperatura de Reação: 37°C e temperatura ambiente

## PROCEDIMENTO

Levar os reagentes e amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova. Uma vez iniciada a análise, esta

deve ser completada sem interrupção.

Processar simultaneamente 1 Branco, 2 Controles Positivos (CP), 3 Negativos (CN) e os Desconhecidos (D). Nas cavidades a serem utilizadas da policubeta colocar:

	D	CP	CN
<b>Amostra</b>	100 ul	-	-
<b>Controle Positivo</b>	-	100 ul	-
<b>Controle Negativo</b>	-	-	100 ul
<b>Conjugado</b>	1 gota	1 gota	1 gota

Quando utilizar micropipeta automática, dispensar 60 ul. Devido a alta densidade do conjugado, é importante misturar homogeneizando perfeitamente mediante aplicação de batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Para evitar a evaporação, cobrir a placa com uma fita adesiva e incubar em estufa por 2 horas a 37°C. Após, aspirar cuidadosamente o líquido de cada cavidade desprezando-o em um recipiente para dejetos biológicos que contenha hipoclorito de sódio a 5%. Na continuação, lavar 5 vezes com Tampão de Lavagem empregando aproximadamente 300 ul/vez/cavidade. Após cada lavagem, o líquido deve ser descartado no recipiente com hipoclorito. Opcionalmente, utilizar lavador automático. Ao finalizar a última lavagem, eliminar completamente o líquido residual, invertendo a policubeta e batendo-a várias vezes sobre papel absorvente, exercendo uma leve pressão com as mãos nas laterais maiores do suporte, para evitar que as tiras se soltem. Após, adicionar em cada cavidade:

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

Quando utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul. Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Incubar durante 30 minutos em temperatura ambiente e logo colocar:

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

Quando utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul. Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Ler em espectrofotômetro a 450 nm ou efetuar leitura bicromática a 450/620-650 nm. O resultado também pode ser avaliado a simples vista por comparação com os Controles Positivos e Negativos.

## ESTABILIDADE DA MISTURA FINAL DE REAÇÃO

A cor da reação é estável durante 30 minutos, portanto os resultados devem ser observados dentro deste período.

## CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DA CORRIDA

A prova é considerada válida se cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

a) A leitura média dos Controles Negativos, corrigidas contra o branco do reagente, deve ser maior ou igual a 0,600 D.O.

b) A leitura média dos controles Positivos, corrigida contra o Branco do reagente deve ser menor ou igual a 0,200 D.O.

c) A leitura do branco deve ser maior a -0,020 e menor a 0,020 D.O.

Se uma ou mais destas condições não se cumprirem, repetir a prova.

Lembrar que as leituras obtidas dependerão da sensibilidade do equipamento empregado.

### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A reatividade da amostra é determinada relacionando a absorbância da amostra em relação ao valor do Cut-off.

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

onde:

CN: média das leituras dos Controles Negativos

CP: média das leituras dos Controles Positivos

**Amostras Reativas:** são consideradas aquelas com absorbâncias menores ou iguais ao valor do cut-off. Estas amostras devem ser ensaiadas novamente.

**Amostras não Reativas:** são consideradas aquelas com absorbâncias maiores que o valor cut-off.

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

Constituem causas de resultados errôneos:

- Lavagem incorreta das cubetas de reação;
- Contaminação cruzada de amostras não reativas com anticorpos procedentes de uma amostra reativa;
- Contaminação da solução cromogênica com agentes oxidantes ( cloro, etc.);
- Contaminação do Stopper;
- Falta de homogeneização das amostras com o conjugado;
- Conservação inadequada das tiras de cubetas não utilizadas;
- Contaminação do Tampão de Lavagem diluído: recomenda-se conferir a limpeza dos frascos onde é preparado e armazenado. Se for observada turbidez ou precipitação na preparação, desprezá-lo;

Não utilizar banho-maria para incubação.

Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição à infecção pelo HBV.

Ocasionalmente, ao efetuar leituras bicromáticas, podem ser obtidas absorbâncias negativas que não invalidam a determinação. Isto se deve a que algumas amostras resultam em leituras inferiores ao Branco de Reativos.

Certifique-se de que o sistema de lavagem que está sendo usado aspire totalmente o conteúdo das cavidades e que a altura da solução de lavagem dispensada seja regular até a borda da cavidade.

### DESEMPENHO

**a) Sensibilidade:** a sensibilidade baseada na prevalência assumida de 100% de anticorpos anti-HBc em indivíduos com hepatite B, é estimada em 98,7%.

**b) Especificidade:** a especificidade baseada na prevalência assumida de 0% de anticorpos anti-HBc em indivíduos sadios é estimada em 99,4%.

**c) Estudo populacional:** em uma população geral que inclui indivíduos sadios, doadores, com hepatite B e com outras patologias, a correlação em relação a métodos de referência foi de 98,7%.

### APRESENTAÇÃO

Kit para 96 determinações (Cód. 1483255) contendo:

- 1 Policubeta sensibilizada
- 1 frasco com 9 ml de Conjugado
- 1 frasco com 9 ml de Revelador A
- 1 frasco com 9 ml de Revelador B
- 1 frasco com 9 ml de Stopper
- 1 frasco com 240 ml de Tampão de Lavagem concentrado
- 1 frasco com 2 ml de Controle Positivo
- 1 frasco com 2,5 ml de Controle Negativo

### REFERÊNCIAS

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

## EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

**Policubeta** **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

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

Tampão de Lavagem Concentrado

**Conjugado**

Conjugado

**Stopper**

Stopper

**Revelador** **A**

Revelador A

**Revelador** **B**

Revelador B

**Control** **+**

Controle Positivo

**Control** **-**

Controle Negativo

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

**EC** **REP** Representante autorizado na Comunidade Europeia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após da reconstituição

**Cont.**

Conteúdo

**LOT**

Número de lote



Elaborado por:

**Xn**



Nocivo



Corrosivo / Caústico

**XI**



Irritante



Consultar as instruções de uso

**Calibr.**

Calibrador

**CONTROL**

Controle

**CONTROL** **+**

Controle Positivo

**CONTROL** **-**

Controle Negativo

**REF**

Número de catálogo



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina