

PARA SER USADO SOLO EN INVESTIGACIÓN

RELEVANCIA CLÍNICA

El virus de la hepatitis B (VHB), es el agente causal de una inflamación hepática que puede cursar de forma aguda o crónica, pudiendo generar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Se estima que al menos una tercera parte de la población mundial ha contraído el VHB, afectando significativamente a la población adulta joven susceptible a la infección, principalmente por vía sexual. Durante la infección, los primeros **anticuerpos** en aparecer en sangre son los dirigidos contra el core (**HBcAb**), los anticuerpos tipo IgG anti HBcAb persisten incluso en la cronicidad y se detectan en todos los pacientes, por lo que su determinación es de gran validez y relevancia para el diagnóstico de la infección (ver figura 1). Es importante resaltar que en las fases agudas de la infección el primer marcador en aparecer es el **antígeno** de superficie (**HBsAg**) y luego de 5 semanas son detectables los anticuerpos IgG anti HBc, por lo que se recomienda determinar el HBsAg y el anti-HBc de manera simultánea.

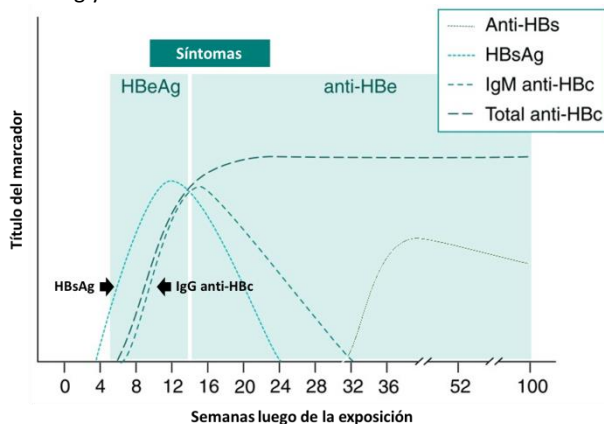


Figura 1. Marcadores serológicos en infectados con el VHB.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La proteína recombinante core del virus de la hepatitis B (VHB), obtenida en un sistema de expresión procariótico, posee gran capacidad para discriminar serológicamente a los individuos sanos y a los infectados con el VHB. **La evaluación de la validez y seguridad diagnóstica muestra sensibilidad y valor predictivo negativo de 100%, así como especificidad y valor predictivo positivo por encima del 90%.** Estos resultados indican que HBcAb ELISA es un ensayo inmunoenzimático válido para el despistaje de la infección con el virus de la hepatitis B, a través de la determinación cualitativa de anticuerpos IgG anti core. En el HBcAb ELISA se incubó el suero problema con el antígeno core inmovilizado en placas de microtitulación, el inmunocomplejo se evidencia de forma directa por la reacción colorimétrica mediada por un sistema de detección acoplado a la enzima peroxidasa. **El ensayo permite la detección de anticuerpos tipo IgG.**

COMPOSICIÓN DEL KIT

- 1 placa de microtitulación de 96 pozos con rHBcAg.
- 4 viales de 500 µL de suero control negativo.
- 4 viales de 500 µL de suero control positivo.
- 2 viales de 12 mL de solución diluyente de muestra (tapa verde).
- 2 viales de 6 mL de buffer de conjugado (tapa azul).
- 6 viales de conjugado (tapa blanca). **Guardar a -20°C.**
- 1 vial de 50 mL del reactivo W (**CONCENTRADO, 10X**).
- 1 vial de 5,5mL del reactivo A (**CONCENTRADO, 2X**).
- 1 vial de 5,5mL del reactivo B (**CONCENTRADO, 2X**).
- 2 viales de 5,5mL de solución S.

ALMACENAMIENTO

- Almacenar el kit y sus componentes a 2-8 °C.
- **Almacenar los sueros a -20 °C.**
- **Almacenar el conjugado a -20 °C.**
- No exponer los componentes del kit al sol, calor, o iluminación fuerte durante su almacenamiento/uso.

MUESTRAS

Usar muestras de suero sin signos de lipemia, hemólisis o contaminación. Las muestras congeladas deben homogeneizarse antes de cada ensayo. Se sugiere evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, ya que esto puede producir resultados falsos.

IMPORTANTE

- No usar jamás pool de sueros, pues esta mala práctica favorece el reporte de resultados negativos falsos.
- No utilizar reactivos o microplacas de lotes diferentes.
- Evitar pipetear repetidamente los reactivos en stock, pues esto puede causar contaminación.
- Se recomienda alicuotar el **reactivo A (alícuotas de 900 µL, suficiente para dos tiras y almacenar a 4°C y protegido de la luz)**. El pipeteo repetido del vial puede contaminarlo y en consecuencia pérdida de su actividad.
- HBcAb ELISA contiene sueros de origen humano, seronegativos para VIH-1 y 2, VHC, y VHB (excepto el suero control positivo). Debido a la posibilidad de falsos negativos y a la existencia de otros múltiples patógenos, se recomienda acatar estrictamente las medidas de bioseguridad universales para el manejo de muestras biológicas.

PROCEDIMIENTO

1. Disponer un pozo (de referencia) con 200 µL de solución diluyente de muestra (tapa azul).
2. Disponer un pozo con 200 µL de control negativo.
3. Disponer un pozo con 200 µL de control positivo.
4. Colocar las muestras, en los pozos respectivos, agregando 195 µL de solución diluyente de muestra (tapa azul) y mezclando con 5 µL del suero problema.
5. Incubar por 45 min a 37°C.
6. Preparar el buffer W. Por cada tira de 8 pozos se requieren ~40 mL, para ello tomar 4 mL de reactivo W (**CONCENTRADO, 10X**) y mezclar con 36 mL de agua destilada.
7. Preparar el conjugado. Anadir **1,9 mL (1900 ul)** del buffer del conjugado (tapa verde) en 1 vial del conjugado (tapa blanca), mezclar. **Una vez reconstituido almacenar a -20 °C.** Un vial reconstituido alcanza para 2 tiras de 8 pozos.
8. Realizar 6 lavados con buffer W.
9. Colocar 100 µL del conjugado por cada pozo, incluyendo el pozo blanco o de referencia.
10. Incubar por 45 min a 37°C.
11. Realizar 6 lavados con buffer W.
12. Preparar el sustrato mezclando partes iguales del reactivo A (**CONCENTRADO, 2X**) con el reactivo B (**CONCENTRADO, 2X**). Por cada tira de 8 pozos se requiere un volumen total de 800 µL. **IMPORTANTE: debe prepararse solo lo necesario para cada ensayo y al momento de necesitarse, NO realizar la mezcla directamente en los pozos de la placa.**
13. Colocar 100 µL del sustrato por cada pozo.
14. Incubar por 7-10 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
15. Colocar 100 µL de solución S.
16. Leer la densidad óptica en un espectrofotómetro usando un filtro de 450 nm. También es recomendable usar 620 nm como filtro de referencia

CALCULO DE LOS RESULTADOS

1. En cada ensayo deben incluirse: un blanco, los sueros controles positivos y negativos, por duplicado, de no hacerse, la interpretación de la prueba puede producir resultados falsos.
2. El valor del **blanco o pozo de referencia** deber ser restado a los valores obtenido de las densidades ópticas de los controles y sueros problemas
3. Determinar los valores promedio de los controles positivos y negativos.
4. Para que el ensayo sea válido, el valor promedio de los controles positivos (**MCP**) debe ser mayor o igual a 2,4 veces al valor promedio de los controles negativos (**MCN**). Es decir: **MCP / MCN = mayor de 2,4.**
5. Una vez determinada la validez del ensayo, calcular el valor del **punto de corte o cutoff**. Usar la fórmula: **Cutoff = 1,9 x MCN.**
6. **Los valores de DO por encima del cutoff se consideran positivos.** Los valores de DO por debajo del cutoff se consideran negativos. Los valores de DO muy cercanos al cutoff se consideran **indeterminados**, se recomienda repetir la prueba y/o hacer seguimiento al paciente. **Para ser considerado indeterminado el resultado de la división del suero problemas entre el MCN debe ser mayor de 1,8 y menor de 1,9**
7. EJEMPLO:
Resultados controles negativos: 0,210 y 0,236
Resultados controles positivos: 0,650 y 0,690
 $MCN = (0,210 + 0,236) / 2 = 0,223$
 $MCP = (0,650 + 0,690) / 2 = 0,670$
 $MCP / MCN = 0,670 / 0,223 = 3$
 $Cutoff = 1,9 \times 0,223 = 0,424$
Indeterminado: Suero problema / MCN = 0,421 / 0,223 = 1,88. En estos casos debe recomendarse, repetir el ensayo en 3-4 semanas

1. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Methods Enzymol. 1980;70(A):419-39.
2. Márquez-Toro Y, Bastidas-Azuaje MA, Teran-Angel G, Silva-Gutiérrez N, Colmenares M, Márquez-Miranda M, Bellorín AV, Volcanes I, Guzman-Escalona Y, Calderón A, Cantor-García A, Salmen S. Desarrollo de un ensayo casero para la detección de IgG contra el core del virus de la Hepatitis B. Avanz Biomed 2016; 5.
3. Donis JH. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. Avanz Biomed 2012; 1 (2), 73-81.
4. You CR, Lee SW, Jang JW, Yoon SK. Update on hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol. 2014;20(37):13293-305.