U.S. LICENSE 1236

Raritan, New Jersey 08869

Recombinant Antigens Provided by

CHIRON

Chiron Corporation
Emeryville CA 94608

© OCD 1991

Printed in U.S.A.

Hepatitis B Virus Core Antigen (Recombinant)
ORTHO® HBc ELISA Test System

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibody to Hepatitis B Virus Core Antigen (anti-HBc) in Human Serum or Plasma

REF

933245
933275

English .....Page 3

Français .....Page 11

Español .....Pagina 19

IVD

ORTHO

Revised June 2006
631201327

Hepatitis B Virus Core Antigen (Recombinant)
ORTHO® HBc ELISA Test System

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibody to Hepatitis B Virus Core Antigen (anti-HBc) in Human Serum or Plasma

NAME AND INTENDED USE

ORTHO HBc ELISA Test System is a qualitative enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of total antibody to hepatitis B virus core antigen (anti-HBc) in human serum or plasma indicated for the screening of blood and blood products intended for transfusion and as an aid in the diagnosis of ongoing or previous hepatitis B virus infection.

SUMMARY AND EXPLANATION

A variety of serologic markers appear following infection with hepatitis B virus (HBV). The first marker to appear is usually hepatitis B surface antigen (HBsAg). Antibodies to hepatitis B core antigen (anti-HBc) appear next and remain detectable following the clearance of HBsAg and into convalescence. Antibodies to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) generally appear a few weeks after the clearance of HBsAg.

The determination of anti-HBc in serum and plasma may be used as an aid to monitor the progress of HBV infection. Anti-HBc appears in virtually all individuals infected with HBV and is an accurate serological marker of recent and past infection.[1,2] During the acute phase of HBV infection, anti-HBc appears shortly after the appearance of HBsAg and persists following HBsAg clearance.[3] In those cases where HBsAg has cleared and the appearance of anti-HBs is delayed, anti-HBc may be the only serological marker of recent HBV infection.[4] Anti-HBc is found in virtually all patients with chronic hepatitis B.[5]

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedures provide a means for routinely detecting antibodies to specific antigens.[6,7] The detection of total anti-HBc has value considering the association of such antibodies with HBV infections.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The assay procedure is a three-stage test carried out in a microwell coated with recombinant-derived hepatitis B core antigen (rHBcAg). The recombinant antigen used in this assay is prepared under U.S. License by Chiron Corporation under a shared manufacturing arrangement. The recombinant antigen is produced in *Escherichia coli*.

In the first stage, a test specimen is placed directly in the test well containing specimen diluent and incubated for a specified length of time. If anti-HBc is present in the specimen, antigen-antibody complexes will form on the microwell surface. If anti-HBc is not present, complexes will not form and the unbound serum or plasma proteins will be removed in the washing step.

In the second stage, antibody conjugate is added to the test well. The antibody conjugate is a mixture of murine monoclonal antibodies specific for human IgG and IgM. The conjugate will bind specifically to the antibody portion of the antigen-antibody complexes. If antigen-antibody complexes are not present, the unbound conjugate will be removed by washing.

In the third stage, an enzyme detection system composed of *o*-phenylenediamine (OPD) and hydrogen peroxide is added to the test well. If bound conjugate is present, the OPD will be oxidized, resulting in a colored end-product. Sulfuric acid is then added to stop the reaction.

The color intensity depends on the amount of bound conjugate and therefore is a function of the concentration of anti-HBc present in the specimen. The color intensity is measured with a microwell reader.

REAGENTS

480 Test Kit Components (Product Code 933245)

- 5 Hepatitis B Virus Core Antigen (HBcAg) (Recombinant) -Coated Microwell Plates (8 strips of 12 wells each in holder)
- 1 bottle Antibody Conjugate (Murine Monoclonal) (125 mL)–mixture of anti-human IgG and anti-human IgM conjugated to horseradish peroxidase with protein stabilizers
  Preservative: 1% ProClin™ 300
- 1 bottle Specimen Diluent (150 mL)–phosphate-buffered saline with protein stabilizers
  Preservative: 0.02% thimerosal
- 1 vial OPD Tablets (30 tablets)–contains *o*-phenylenediamine•2HCl
- 1 bottle Substrate Buffer (190 mL)–citrate-phosphate buffer with 0.02% hydrogen peroxide
  Preservative: 0.01% thimerosal
- 1 vial Positive Control (Human) (1.0 mL)
  Source: Human serum or plasma containing anti-HBc and nonreactive for HBsAg and antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2)
  Preservative: 0.02% thimerosal
- 2 vials Negative Control (Human) (1.0 mL each)
  Source: Human serum nonreactive for anti-HBc, HBsAg and antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2)
  Preservative: 0.02% thimerosal
- 21 Plate sealers, disposable

2400 Test Kit Components (Product Code 933275)

25 Hepatitis B Virus Core Antigen (HBcAg) (Recombinant) -Coated Microwell Plates (8 strips of 12 wells each in holder)

5 bottles Antibody Conjugate (Murine Monoclonal) (125 mL each)–mixture of anti-human IgG and anti-human IgM conjugated to horseradish peroxidase with protein stabilizers
Preservative: 1% ProClin™ 300

5 bottles Specimen Diluent (150 mL each)–phosphate-buffered saline with protein stabilizers
Preservative: 0.02% thimerosal

3 vials OPD Tablets (30 tablets each)–contains *o*-phenylenediamine•2HCl

5 bottles Substrate Buffer (190 mL each)–citrate-phosphate buffer with 0.02% hydrogen peroxide
Preservative: 0.01% thimerosal

4 vials Positive Control (Human) (1.0 mL each)
Source: Human serum or plasma containing anti-HBc and nonreactive for HBsAg and antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2)
Preservative: 0.02% thimerosal

5 vials Negative Control (Human) (1.0 mL each)
Source: Human serum nonreactive for anti-HBc, HBsAg and antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2)
Preservative: 0.02% thimerosal

84 Plate sealers, disposable

CAUTION: HANDLE AS IF CAPABLE OF TRANSMITTING INFECTIOUS AGENTS.

Store at 2 to 8°C

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

ORTHO HBc ELISA Test System meets the requirements of the FDA Antibody to Hepatitis B Virus Core Antigen Reference Panel.

PRECAUTIONS

1. CAUTION: Some components of this kit contain human blood derivatives. No known test method can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious. It is recommended that these reagents and human specimens be handled using established good laboratory working practices.[8,9]
2. Wear disposable gloves while handling kit reagents and specimens. Thoroughly wash hands afterward.
3. All specimens should be handled as potentially infectious agents.
4. Dispose of all specimens and materials used to perform the test as if they contain infectious agents. Disposal of all specimens and materials should comply with all local, state and federal waste disposal requirements.[10,11]
5. 4N sulfuric acid (H_2SO_4) is a strong acid. Wipe up spills immediately. Flush the area of the spill with water. If the acid contacts the skin or eyes, flush with copious amounts of water and seek medical attention.
6. Handle OPD tablets with plastic or Teflon®-coated forceps. Metal forceps may react with the tablets and interfere with the test results.
7. Avoid contact of OPD with eyes, skin or clothing, as OPD may cause irritation or an allergic skin reaction. If OPD should come into contact with the skin, wash thoroughly with water. OPD is toxic for inhalation, ingestion and skin contact. In case of malaise, call a physician. Following are the Risk and Safety Requirements.[12]

   N,R: 20/21-25-36-40-43-50/53-68 - Harmful by inhalation and in contact with skin. Toxic if swallowed. Irritating to eyes. Limited evidence of a carcinogenic effect. May cause sensitization by skin contact. Very toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment. Possible risks of irreversible effects. S: 26-28-36/37-45-60-61 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. After contact with skin, wash immediately with plenty of water. Wear suitable protective clothing and gloves. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible). This material and its container must be disposed of as hazardous waste. Avoid release to the environment. Refer to special instructions/Safety data sheets.
8. OPD tablets are light- and moisture-sensitive. Keep vial **tightly** closed when not in use. **Bring vial to room temperature (15 to 30°C) before opening** the vial. The desiccant pouch must be retained in the vial at all times. Do not use tablets which are yellow or broken.
9. Distilled or deionized water must be used for Wash Buffer preparation. Clinical laboratory reagent water Type I or Type II is acceptable.[13] Store the water in nonmetallic containers.
10. Do not mix reagents from kits with different lot numbers. Any lot number of 20X Wash Buffer Concentrate may be used provided it is not beyond its labeled expiration date.
11. All reagents and components **must** be at room temperature prior to use and kit components returned to 2 to 8°C after use.
12. The microwell strips are sealed in protective pouches with a humidity indicator desiccant. The desiccant, normally blue/purple in color, will turn pink if moisture is present in the pouch. If the desiccant is pink, the microwell strips should not be used.
13. Do not use reagents beyond their labeled expiration date.
14. Cross-contamination between reagents will invalidate the test results. Labeled, dedicated reservoirs for the appropriate reagents are recommended.
15. Ensure that specimen is added to the microwell. Failure to add specimen may produce an erroneous nonreactive result.
16. When using a single-channel micropipette for manual sample addition, use a new pipette tip for each specimen to be assayed. When using a multichannel micropipette, new tips are to be used for each reagent to be added.
17. Strict adherence to the specified wash procedure is crucial to ensure optimum assay performance. (See Step 7 of **Test Procedure**.)

18. Do not allow microwells to become dry once the assay has begun.
19. Do not touch the bottom exterior surface of the microwells. Fingerprints or scratches may interfere with reading the microwells.
20. Ensure that the microwell strips are level in the microwell strip holder during the test procedure. If necessary, wipe the bottom of the microwell strips carefully with a soft, lint-free, absorbent tissue to remove any moisture, dust or debris before reading.
21. Negative or positive control values which are not within the expected range (refer to **Quality Control Procedures** section) may indicate a technique problem or product deterioration.
22. Do not allow sodium hypochlorite fumes from chlorine bleach or other sources to contact the microwell strips during the assay as the color reaction may be inhibited.
23. All pipetting equipment should be used with care, calibrated regularly and maintained following the equipment manufacturer's instructions.
24. The microwell reader should contain a reference filter with a setting at 620 or 630 nm. If an instrument without a reference filter is used, areas in the bottom of the microwells that are opaque, scratched or irregular may cause elevated readings.
25. Specimen Diluent may contain crystals after being stored at refrigerated temperature. To dissolve the crystals, remove the bottle of Specimen Diluent from the refrigerator and occasionally invert it as the Specimen Diluent comes to room temperature. If the solution still contains crystals once at room temperature, do not use.
26. ProClin™ 300 is included as a preservative in the Conjugate Reagent. Following are the Risk and Safety Requirements.[12]

    R: 36/38-43 - Irritating to eyes and skin. May cause sensitization by skin contact.
    S: 23-24/25 - Do not breathe vapor/spray. Avoid contact with skin and eyes.

PREPARATION OF REAGENTS

1. **Preparation of Wash Buffer (1X):** Mix 50 mL of 20X Wash Buffer Concentrate with 950 mL of distilled or deionized water. Wash Buffer (1X) is stable for 30 days when stored at room temperature. For longer storage (up to 60 days), keep at 2 to 8°C. Record the date the Wash Buffer (1X) is prepared and the expiration date on the container. Discard Wash Buffer (1X) if visibly contaminated.

   NOTE: Any lot number of 20X Wash Buffer Concentrate may be used to prepare this reagent provided it is not used beyond its labeled expiration date.

2. **Preparation of Substrate Solution:** Clean glass or plastic vessels must be used. Prior to the end of the second incubation, transfer a sufficient amount of Substrate Buffer to a container and protect the contents from light. Completely dissolve the appropriate number of OPD tablets in Substrate Buffer prior to use.

   Each microwell plate requires at least 20 mL of Substrate Solution. More Substrate Solution may be needed depending upon the reagent dispenser used. See the instrument manufacturer's instructions for additional reagent required. Below are guidelines for general use.

Number of Wells	Number of Plates	Number of OPD Tablets	Substrate Buffer (mL)
48	0.5	1	12
96	1	2	24
144	1.5	3	36
192	2	4	48
240	2.5	5	60
288	3	6	72

   The Substrate Solution is stable for 60 minutes after the addition of OPD tablets when held at room temperature in the dark and should be colorless to very pale yellow when used. Record the time when the OPD tablets are added to the Substrate Buffer and when it will expire on the container. **If it is noticeably yellow in color, discard and prepare more Substrate Solution as required.**

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

No special preparation of the patient is required prior to blood collection. Blood should be collected by approved medical techniques. Plasma collected with an improper ratio of specimen to anticoagulant should not be used. Serum or plasma collected in EDTA, heparin or citrate-based anticoagulants may be used and should be tested as soon as possible following collection. **Do not use heat-treated specimens. Do not use azide to preserve specimens. Do not test patient or donor samples containing azide. Sodium azide inhibits horseradish peroxidase activity.** Serum or plasma may be stored at 2 to 8°C for up to seven days. If longer storage is necessary, the specimens should be frozen (-20°C or lower) to limit possible contamination. Storage of specimens in self-defrosting freezers is not recommended. No effect was observed on reactivity in ORTHO HBc ELISA Test System when 12 weakly reactive and 12 nonreactive specimens were subjected to five freeze-thaw cycles. Clear, nonhemolyzed specimens are preferred. Precipitates in specimens should be removed by centrifugation.

All specimens should be handled as if capable of transmitting infectious agents. If specimens are to be shipped, they must be packed in compliance with federal regulations covering the transportation of etiologic agents.[14] Studies have demonstrated that specimens may be shipped at ambient temperature (up to 37°C) or refrigerated (2 to 8°C) for up to six days, and upon arrival should be stored at 2 to 8°C. For shipments requiring extensive transit times (greater than six days), specimens should be kept frozen (-20°C or lower).

PROCEDURE

Materials Provided

ORTHO HBc ELISA Test System

480 Test Kit (Product Code 933245)
2400 Test Kit (Product Code 933275)

(See **REAGENTS** for complete listing)

Materials Required But Not Provided

1. Adjustable multichannel micropipette capable of delivering 50 µL and 200 µL with at least ± 5% accuracy or equivalent reagent dispenser
2. Fixed or adjustable single-channel micropipette capable of delivering 10 µL with at least ± 10% accuracy or equivalent sample dilutor
3. 5 µL to 250 µL disposable pipette tips or equivalent
4. Appropriately sized serological pipette or graduated cylinder
5. Multichannel micropipette reservoir or equivalent reagent container
6. Multichannel aspirator-washer device capable of dispensing and aspirating 300 µL to 800 µL per well. (Consult the device's operator's manual for additional technical information.)
7. Dual wavelength microwell reader capable of reading at 490 nm or 492 nm with a reference filter of 620 nm or 630 nm. If an instrument without a reference filter is used, areas in the bottom of the microwells that are opaque, scratched or irregular may cause elevated readings. Linearity of the microwell reader must range from at least 0 to 2.5 absorbance units. Consult the instrument manufacturer's specifications.
8. 37°C ± 1°C incubator (dry or humidified)
9. Distilled or deionized water, clinical laboratory reagent water Type I or Type II is acceptable (see **PRECAUTIONS** section)
10. 5.25% sodium hypochlorite (chlorine bleach)
11. 4N sulfuric acid (H_2SO_4)–available in the United States from Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Product Code 933040) or equivalent. To determine the suitability of another source of acid, prepare Substrate Solution as described under **PREPARATION OF REAGENTS**. Add 200 µL of Substrate Solution to three microwells, then add 50 µL of the 4N H_2SO_4 to be tested to each microwell. Read the microwells at a wavelength of 490 nm or 492 nm with a reference filter of 620 nm or 630 nm at "0 time" and "60 minutes." All absorbance values at each time interval must be less than or equal to 0.050.
12. Black microwell strips (Product Code 651-20-003-1: Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.) or equivalent uncoated microwells
13. 20X Wash Buffer Concentrate (Product Code 933730, 6 x 150 mL; Product Code 933780, 4 x 450 mL; Product Code 933790, 12 x 450 mL: Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.)–phosphate buffer with sodium chloride and detergent. Preservative: 2% 2-chloroacetamide
14. Variable speed microwell plate shaker capable of 100 to 400 rpm for use when <u>not</u> using a pipetter-dilutor for sample delivery

Test Procedure

1. Prior to the beginning of the procedure, bring kit components to room temperature (15 to 30°C). Invert liquid reagents gently several times, but avoid foaming. Check the incubator temperature; maintain at 37°C ± 1°C.
2. Determine the total number of wells needed for the assay. In addition to specimens, one substrate blank, three negative controls and two positive controls will be included on each plate or partial plate. If the entire strip is not needed, an appropriate number of wells can be broken off. Unused wells should be stored at 2 to 8°C in the supplied foil pouch, tightly sealed **with desiccant** and used within 14 days of opening the foil pouch. Record the date the pouch is opened and the expiration date of the unused wells on the pouch.

   Performing the test on less than a full plate is permitted as long as the following conditions are met.

   Microwell strips from different plates can be mixed to assemble full or partial plates as long as they are from the same lot, within the open pouch expiration date and have come from plates that have previously demonstrated proper response to kit controls.

   When assembling a plate which contains strips from a newly opened, previously untested plate, one of these strips should be placed at the beginning of the plate and receive the full complement of kit controls.

   CAUTION: Handle microwell strips with care. Do not touch the bottom exterior surface of the wells.
3. Assemble the microwell strips into the microwell strip holder, if necessary. **Microwell strips must be level in the microwell strip holder.** For incomplete plates, add black or uncoated microwell strips.
4. Prepare a record (plate map) identifying the placement of the controls and specimens in the microwells.

   Arrange the assay control wells so that well 1A is the substrate blank. From well 1A arrange all controls in a horizontal or vertical configuration as follows. Configuration is dependent upon software.

Well 1A	Substrate Blank
	Negative Control
	Negative Control
	Negative Control
	Positive Control
	Positive Control

5. **Verify that any manual dispensing equipment is set to deliver the specified volumes as stated in the procedure, following the equipment manufacturer's instructions.** Add controls and specimens to the microwells as follows:
   a. 200 µL of Specimen Diluent to all wells, **except 1A**.
   b. 10 µL of the controls or specimens to the appropriate wells.
   c. If the controls and specimens have been manually delivered, after filling the microwells, place the microwell strip holder on a microwell plate shaker to mix for 5 to 10 seconds. The shaker should be used at a slow to moderate speed, taking care to avoid splashing of the contents of the test wells.
6. For manual processing of microwell plates, cover the microwell strip holder with a plate sealer. When using an automated microplate processor for incubation, follow the instrument manufacturer's recommendations with regard to microwell plate sealing. Incubate at 37°C ± 1°C for 60 minutes ± 5 minutes.
7. Level the strips in the microwell holder, if necessary. With an aspirator-washer device, aspirate and wash all wells **five** times with Wash Buffer (1X).

CAUTION: Strict adherence to the specified wash procedure is crucial to ensure optimum assay performance. Follow the steps specified in order to ensure thorough washing.

a. Aspirate the sample solutions from microwells and then completely fill wells with Wash Buffer. Do not allow the wells to overflow. Allow approximately 20 seconds between the addition of Wash Buffer and subsequent aspiration.

b. Complete the aspirate/fill sequence **four** additional times.

c. Completely aspirate wells. Invert the plate and firmly tap on a clean paper towel to remove excess Wash Buffer, if necessary.

8. Add 200 µL of Antibody Conjugate to all wells, **except 1A**.
9. For manual processing of microwell plates, cover the microwell strip holder with a **new plate sealer**. When using an automated microplate processor for incubation, follow the instrument manufacturer's recommendations with regard to microwell plate sealing. Incubate at 37°C ± 1°C for 60 minutes ± 5 minutes.
10. Prepare **sufficient** Substrate Solution prior to use in Step 12 to allow time for the OPD tablets to **dissolve completely**. Refer to **PREPARATION OF REAGENTS**. **Do not use more than a single preparation of Substrate Solution on a plate.**
11. After the second incubation, wash the wells as described in Step 7.
12. Add 200 µL of Substrate Solution to all wells, **including 1A**.
13. Incubate at room temperature in the dark for 30 minutes ± 1 minute.
14. Add 50 µL of 4N sulfuric acid (H_2SO_4) to all wells, **including 1A**. To ensure proper mixing, acid should be added forcibly in a steady stream. If necessary, gently tap the plate or use a microwell plate shaker to mix the contents. Care should be taken to avoid splashing of the contents of the microwells. When using an automated microplate processor, follow the instrument manufacturer's instructions with regard to mixing.
15. If necessary, wipe moisture from the bottom of the microwell strips carefully with a soft, lint-free, absorbent tissue before reading. If necessary, level the strips in the microwell holder. Read the microwell strip plate at a wavelength of 490 nm or 492 nm. For dual wavelength readers set the reference wavelength at 620 nm or 630 nm. Blank the reader on well 1A according to the instrument manufacturer's instructions.

    NOTE: Microwell strip plates must be read within 60 minutes following the addition of 4N sulfuric acid. Plates must be stored in the dark until read.

Quality Control Procedures[15,16]

1. **Substrate Blank Acceptance Criteria**

   A plate is considered valid with respect to the substrate blank if the absorbance value of the substrate blank well (well 1A) is greater than or equal to -0.020 and less than or equal to 0.050.

2. **Negative Control Acceptance Criteria**

   a. Individual negative control values must be less than or equal to 0.350 and greater than or equal to -0.005. Numbers which are between 0.000 and -0.005 inclusive are valid and should be rounded to 0.000 for calculations. If one of the three negative control values is outside either of these limits, recalculate the negative control mean ($NC\bar{x}$) based on the other two acceptable control values. The plate is invalid and the test must be repeated if two or more of the three control values are outside either of the limits.

   b. Determine the mean of the negative control values ($NC\bar{x}$).

   Example:

Negative Control	Absorbance
1	0.200
2	0.180
3	0.160

Total Absorbance = 0.540

$$NC\bar{x} = \frac{\text{Total Absorbance}}{3} = 0.180$$

3. **Positive Control Acceptance Criteria**

   The positive control is used to verify that the test kit components are capable of detecting a reactive specimen provided the test procedure has been strictly adhered to.

   A plate is considered valid with respect to the positive control if both positive control values are greater than or equal to **0.800**, within the linear range of the microwell reader and do not differ by more than **0.500**. Any other values for the positive control are considered invalid.

   NOTE: Results beyond the upper limit of the linear range of the microwell reader may appear as "OVER" or "***" or ">".

4. **Calculation of the Cutoff Value**

   Cutoff Value = $NC\bar{x}$ + 0.400

   Example:

Negative Control	Absorbance
1	0.200
2	0.180
3	0.160

Total Absorbance = 0.540

$$NC\bar{x} = \frac{\text{Total Absorbance}}{3} = 0.180$$

Cutoff Value = 0.180 + 0.400 = 0.580

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Specimens with absorbance values less than -0.005 should be retested in a single microwell. The specimen should be considered nonreactive if the retest absorbance value is less than the Cutoff Value, even if the retest absorbance value remains less than -0.005.
2. Specimens with absorbance values less than the Cutoff Value and greater than or equal to -0.005 are considered nonreactive. Further testing is not required.
3. Specimens with absorbance values greater than or equal to the Cutoff Value are considered initially reactive and should be retested in duplicate before final interpretation.
4. Upon retesting an initially reactive specimen, the specimen is considered repeatedly reactive for anti-HBc if one or both duplicate determination(s) is (are) reactive, i.e., equal to or greater than the Cutoff Value.
5. After retesting an initially reactive specimen, the specimen is considered nonreactive for anti-HBc if both duplicate determinations are nonreactive, i.e., less than the Cutoff Value.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

ORTHO HBc ELISA Test System is limited to the detection of anti-HBc in human serum or plasma. The presence of anti-HBc does not constitute a diagnosis of hepatitis B infection but may be indicative of recent and/or past infection by hepatitis B virus. A nonreactive test result does not exclude the possibility of exposure to hepatitis B virus. Levels of anti-HBc may be undetectable in early infection.

The positive control in the test kit is not to be used to quantitate assay sensitivity. The positive control is used to verify that the test kit components are capable of detecting a reactive specimen provided the test procedure has been strictly adhered to.

When positive control values are beyond the linear range of the microwell reader, the positive control cannot be used to assess assay precision.

EXPECTED RESULTS

The frequency of anti-HBc in a population varies widely depending upon the geographic locale and the population under study. In one study of volunteer blood donors nonreactive for HBsAg, 1% was positive for anti-HBc.[2]

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS[17]

Reactivity in Presumably Healthy Blood Donors

Three independent clinical study sites tested a total of 3010 specimens from presumably healthy blood donors. The results of reactivity with ORTHO HBc ELISA Test System are shown in Table 1.

A total of 3010 specimens were tested, 2969 of which were nonreactive. The repeatedly reactive rate of ORTHO HBc ELISA Test System in this low prevalence population is 1.1%.

Table 1: Detection of Anti-HBc in Serum and Plasma from Presumably Healthy Blood Donors

SITE	NUMBER TESTED	INITIALLY NONREACTIVE	INITIALLY REACTIVE	REPEATEDLY REACTIVE
1	1033	1016 (98.4%)	17 (1.6%)	16 (1.5%)
2	1000	989 (98.9%)	11 (1.1%)	7 (0.7%)
3	977	964 (98.7%)	13 (1.3%)	10 (1.0%)
TOTAL	3010	2969 (98.6%)	41 (1.4%)	33 (1.1%)

Reactivity in Patients with Hepatitis

Specimens from patients with acute hepatitis B infection (A HBV), chronic hepatitis B infection (C HBV), hepatitis A infection (HAV), non-A, non-B hepatitis (HCV) and alcoholic liver disease (LIVER) were tested. Results appear in Table 2.

Table 2: Detection of Anti-HBc in Patients with Hepatitis

GROUP	NUMBER TESTED	INITIALLY NONREACTIVE	INITIALLY REACTIVE	REPEATEDLY REACTIVE
A HBV	25	0	25 (100%)	25 (100%)
C HBV	28	0	28 (100%)	28 (100%)
HAV	10	8 (80%)	2 (20%)	2 (20%)
HCV	10	8 (80%)	2 (20%)	1 (10%)
LIVER	25	12 (48%)	13 (52%)	10 (40%)

The two HAV specimens which were anti-HBc reactive were also anti-HBs reactive. The anti-HBc reactivity for HCV and liver disease specimens is probably the result of other risk factors.

SUMMARY OF REVISIONS

Section	Revision
Front Cover	Standardized cover format including use of IVD symbols.
REAGENTS	Changed conjugate preservative from 0.02% Thimerosal to 1% ProClin™ 300.
PRECAUTIONS	Updated OPD and added ProClin™ 300 safety statements.
GERMAN	Removed German language section.
GLOSSARY	Added new glossary symbol chart.
OCD Identification Page	Updated Chiron logo.
Distributed By	Removed “Distributed By” countries.
BIBLIOGRAPHY	Added bibliographic entry, #12.

Antigène du necléoïde (core) du virus de l'hépatite B (recombinant)

ORTHO® HBc ELISA Test System

Test immuno-enzymatique pour la détection des anticorps dirigés contre l'antigène du nucléoïde du virus de l'hépatite B (anti-HBc) dans le sérum ou le plasma humain

Ce réactif a est enregistré à l'Agence du Médicament sous le numéro H83180.

INTRODUCTION

Le test ORTHO HBc ELISA Test System est un test qualitatif basé sur le principe des tests immuno-enzymatiques, destiné à détecter les anticorps totaux dirigés contre l'antigène du nucléoïde du virus de l'hépatite B (anti-HBc) dans le sérum ou le plasma humain, pour tester le sang et les produits sanguins destinés aux transfusions ou pour aider au diagnostic de l'hépatite virale B présente ou passée.

INTERET DU DIAGNOSTIC

Plusieurs indicateurs sérologiques apparaissent après infection par le virus de l'hépatite B (HBV). Le premier est généralement l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg). Les anticorps dirigés contre l'antigène du nucléoïde de l'hépatite B (anti-HBc) apparaissent ensuite et restent détectables, même après la disparition du HBsAg et pendant la convalescence. Les anticorps dirigés contre l'antigène de surface de l'hépatite B (anti-HBs) apparaissent généralement quelques semaines après la disparition du HBsAg.

La détection des anticorps anti-HBc dans le sérum et le plasma peut être utilisée pour aider à surveiller l'évolution d'une infection par le HBV. Les anticorps anti-HBc apparaissent chez pratiquement tous les patients infectés par le HBV et constituent un indicateur sérologique exact d'une infection récente ou passée.[1,2] Durant la phase aiguë de l'infection par le HBV, les anticorps anti-HBc apparaissent peu de temps après l'apparition du HBsAg et restent présents après sa disparition.[3] Dans les cas où le HBsAg a disparu et l'apparition des anticorps anti-HBs est retardée, les anticorps anti-HBc peuvent constituer le seul indicateur sérologique d'une infection récente par le HBV.[4] Des anticorps anti-HBc apparaissent chez presque tous les patients souffrant d'hépatite B chronique.[5]

Les tests immuno-enzymatiques (ELISA) permettent de détecter de façon automatique les anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques.[6,7] La détection des anticorps totaux anti-HBc présente un intérêt puisqu'ils sont associés aux infections par le HBV.

PRINCIPE DU TEST

Le test se déroule en trois étapes et a pour support réactionnel des micropuits recouverts d'antigène recombinant du nucléoïde de l'hépatite B (rHBcAg). L'antigène recombinant utilisé pour ce test est préparé sous brevet américain par Chiron Corporation suite à un accord commun avec Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. L'antigène recombinant est produit dans *Escherichia coli*.

Dans un premier temps, un échantillon est placé directement dans le puits contenant un diluant, puis est mis à incuber pendant un certain temps. Si des anticorps anti-HBc sont présents dans le prélèvement, des complexes antigènes-anticorps vont se former à la surface du puits. Dans le cas contraire, aucun complexe ne se fixera et les protéines libres du plasma ou du sérum seront éliminées au cours de l'étape de lavage.

Durant la deuxième étape, un conjugué anticorps est ajouté au puits. Ce conjugué anticorps est un mélange d'anticorps monoclonaux murins spécifiques aux IgG et IgM humaines. Le conjugué se fixera spécifiquement à la portion anticorps des complexes antigènes-anticorps. Si ces complexes antigènes-anticorps sont absents, le conjugué libre sera évacué au cours du lavage.

La troisième étape consiste à ajouter dans le puits un système de détection enzymatique composé de *o*-phénylènediamine (OPD) et de peroxyde d'hydrogène. En cas de présence du conjugué fixé, l'OPD est oxydée, entraînant l'apparition d'une coloration. De l'acide sulfurique est alors ajouté pour arrêter la réaction.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de conjugué lié et donc à la concentration d'anticorps anti-HBc présents dans le prélèvement. L'intensité de la coloration est mesurée par un lecteur de microplaques.

MATERIEL FOURNI

Coffret de 480 tests (code produit 933245)

5 plaques de micropuits revêtus d'antigène du nucléoïde du virus de l'hépatite B (HBcAg) (recombinant) (support de 8 barrettes de 12 puits chacune)

1 flacon de conjugué anticorps (monoclonaux murins) (125 ml) – mélange d'anticorps anti-IgG humaines et d'anticorps anti-IgM humaines conjugués à la peroxydase de raifort avec stabilisateurs de protéines
Conservateur : ProClin™ 300 à 1 %

1 flacon de diluant pour échantillon (150 ml) – tampon phosphate salin avec stabilisateurs de protéines
Conservateur : thimérosal à 0,02 %

1 flacon de comprimés d'OPD (30 comprimés) – contenant de l'*o*-phénylènediamine•2HCl

1 flacon de tampon substrat (190 ml) – tampon citrate-phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène à 0,02 %
Conservateur : thimérosal à 0,01 %

1 flacon de contrôle positif (humain) (1,0 ml)
Source : sérum ou plasma humain contenant des anticorps anti-HBc et dépourvu de HBsAg et d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience acquise humaine de type 1 (HIV-1) et de type 2 (HIV-2)
Conservateur : thimérosal à 0,02 %

2 flacons de contrôle négatif (humain) (1,0 ml chaque)
Source : sérum humain dépourvu d'anticorps anti-HBc, de HBsAg et d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience acquise humaine de type 1 (HIV-1) et de type 2 (HIV-2)
Conservateur : thimérosal à 0,02 %

21 films adhésifs, jetables

Coffret de 2400 tests (code produit 933275)

25 plaques de micropuits revêtus d'antigène du nucléoïde du virus de l'hépatite B (HBcAg) (recombinant) (support de 8 barrettes de 12 puits chacune)

5 flacons de conjugué anticorps (monoclonaux murins) (125 ml chaque) – mélange d'anticorps anti-IgG humaines et d'anticorps anti-IgM humaines conjugués à la peroxydase de raifort avec stabilisateurs de protéines
Conservateur : ProClin™ 300 à 1 %

5 flacons de diluant pour échantillon (150 ml chaque) – tampon phosphate salin avec stabilisateurs de protéines
Conservateur : thimérosal à 0,02 %

3 flacons de comprimés d'OPD (30 comprimés chaque) – contenant de l'*o*-phénylènediamine•2HCl

5 flacons de tampon substrat (190 ml chaque) – tampon citrate-phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène à 0,02 %
Conservateur : thimérosal à 0,01 %

4 flacons de contrôle positif (humain) (1,0 ml chaque)
Source : sérum ou plasma humain contenant des anticorps anti-HBc et dépourvu de HBsAg et d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience acquise humaine de type 1 (HIV-1) et de type 2 (HIV-2)
Conservateur : thimérosal à 0,02 %

5 flacons de contrôle négatif (humain) (1,0 ml chaque)
Source : sérum humain dépourvu d'anticorps anti-HBc, de HBsAg et d'anticorps dirigés contre le virus de l'immunodéficience acquise humaine de type 1 (HIV-1) et de type 2 (HIV-2)
Conservateur : thimérosal à 0,02 %

84 films adhésifs, jetables

ATTENTION : MANIPULER CES REACTIFS SELON LES PRECAUTIONS APPROPRIEES RELATIVES A UN MATERIEL POTENTIELLEMENT INFECTIEUX.

Conserver entre 2 et 8 °C

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO

Le test ORTHO HBc ELISA Test System répond aux critères du Comité de référence de la FDA sur les anticorps dirigés contre l'antigène du nucléoïde du virus de l'hépatite B.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. ATTENTION : Ce coffret contient des dérivés de sang humain. Aucune méthode de diagnostic ne pouvant garantir complètement contre les risques de contamination due à de tels produits, il convient de les considérer comme potentiellement infectieux. Toujours manipuler ces réactifs et prélèvements humains conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.[8,9]
2. Porter des gants à usage unique pour toute manipulation des réactifs et prélèvements et se laver soigneusement les mains ensuite.
3. Tous les échantillons doivent être manipulés comme des agents potentiellement infectieux.
4. Evacuer tous les échantillons et matériaux utilisés pour la réalisation du test comme s'ils contenaient des agents infectieux. Leur évacuation doit se faire en respectant toutes les réglementations locales, régionales et nationales en vigueur concernant l'évacuation des déchets.[10,11]
5. L'acide sulfurique 4N (H_2SO_4) est un acide puissant. Essuyez immédiatement toute quantité renversée et rincer la zone à l'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer à grande eau et consulter un médecin.
6. Ne manipuler les comprimés d'OPD qu'avec des pinces en plastique ou recouvertes de Téflon®. Les pinces métalliques peuvent réagir avec l'OPD et fausser les résultats.
7. L'OPD risquant de causer des irritations ou des allergies cutanées, éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements. En cas de contact avec la peau, laver soigneusement à l'eau. L'OPD est toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau. En cas de malaise, appeler un médecin. Ci-dessous figurent les recommandations sur les risques et la sécurité.[12]

   N,R: 20/21-25-36-40-43-50/53-68 - Nocif par inhalation et par contact avec la peau. Toxique en cas d'ingestion. Irritant pour les yeux. Effet cancérogène suspecté - preuves insuffisantes. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. Possibilité d'effets irréversibles.
   S: 26-28-36/37-45-60-61 - En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Eliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux. Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité.
8. Les comprimés d'OPD sont hygroscopiques et sensibles à la lumière. Maintenir le flacon **soigneusement** fermé en dehors de toute utilisation et **le laisser atteindre la température ambiante (15 à 30 °C) avant de l'ouvrir**. Le dessiccateur doit être maintenu en permanence dans le flacon. Ne pas utiliser de comprimés cassés ou présentant une teinte jaune.
9. Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour la préparation du tampon de lavage. Il est possible d'utiliser de l'eau pour réactif de laboratoire clinique de type I ou II.[13] Conserver l'eau dans un récipient non métallique.
10. Ne pas mélanger de réactifs provenant de coffrets comportant des numéros de lots différents. N'importe quel lot de tampon de lavage concentré 20 X peut être utilisé sous réserve d'utilisation avant la date de péremption indiquée pour ce produit.
11. Laisser impérativement revenir tous les réactifs et composants à la température ambiante avant utilisation et les composants du coffret entre 2 et 8 °C après utilisation.

12. Les barrettes de micropuits sont enveloppées dans un emballage scellé contenant un dessiccateur indiquant le taux d'humidité. Généralement, de couleur bleu-violet, il tourne au rose au contact de l'humidité. Dans ce cas, ne pas utiliser les barrettes.
13. Ne pas utiliser de réactifs ayant dépassé la date de péremption indiquée sur leur étiquette.
14. Toute contamination croisée des réactifs invalidera les résultats des tests. Il est donc recommandé de réserver un récipient particulier, étiqueté en permanence.
15. S'assurer que l'échantillon a bien été ajouté dans le micropuits. L'absence d'addition de l'échantillon peut entraîner un résultat négatif erroné.
16. Lors de toute manipulation manuelle avec une pipette à canal unique, utiliser un cône neuf pour chaque prélèvement à tester. Dans le cas de la pipette multicanaux, changer de cône pour chaque réactif introduit.
17. Observer strictement la méthode de lavage prescrite de façon à obtenir les meilleurs résultats possibles (voir étape 7 du **Procedure).**
18. Ne pas laisser les micropuits se dessécher une fois le test commencé.
19. Ne pas toucher avec les doigts la face inférieure externe des micropuits; des empreintes ou des rayures pourraient entraîner des erreurs lors de la lecture.
20. S'assurer que les barrettes sont bien positionnées dans le support pendant le test. Avant la lecture, essuyer avec soin le dessous des barrettes avec un tissu absorbant doux et non pelucheux pour supprimer toute trace d'humidité, de poussière ou de saleté.
21. Les résultats des contrôles positifs ou négatifs non compris dans l'intervalle de valeurs fixées (voir la section sur le **Méthodes de contrôle de qualité**) peuvent indiquer un problème technique ou une détérioration des produits.
22. Au cours du test, ne pas laisser les barrettes entrer en contact avec les vapeurs d'hypochlorite de sodium s'échappant de l'eau de Javel ou de toute autre source, ce qui risquerait d'empêcher la coloration de se produire.
23. Tous les systèmes de distribution doivent être manipulés avec soin, calibrés régulièrement et entretenus suivant les instructions du fabricant.
24. Le lecteur de micropuits doit contenir un filtre de référence à 620 ou 630 nm. Si le lecteur ne contient pas de filtre de référence, les surfaces inférieures des micropuits qui sont opaques, rayées ou irrégulières peuvent entraîner des résultats élevés erronés.
25. Des cristaux peuvent être présents dans le diluant-échantillon après conservation au réfrigérateur. Pour dissoudre ces cristaux, sortir le flacon de diluant-échantillon du réfrigérateur et, durant la remise à température ambiante, le retourner de temps en temps. Si la solution contient encore des cristaux alors qu'elle est parvenue à température ambiante, ne pas l'utiliser.
26. Le conjugué contient du ProClin™ 300 (conservateur). Ci-dessous figurent les recommandations sur les risques et la sécurité.[12]

    R: 36/38–43 - Irritant pour les yeux et la peau. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
    S: 23–24/25 - Ne pas respirer les vapeurs/aérosols. Éviter le contact avec la peau et les yeux.

PREPARATION DES REACTIFS

1. **Préparation du tampon de lavage (1X)** : Mélanger 50 ml de tampon de lavage concentré à 950 ml d'eau distillée ou désionisée. Le tampon de lavage (1X) est stable pendant 30 jours à température ambiante. Pour une conservation plus longue (jusqu'à 60 jours), le conserver entre 2 et 8 °C. Noter la date de préparation du tampon de lavage (1X) et sa date de péremption sur le récipient. Jeter le tampon de lavage (1X) si une contamination est observée.

   REMARQUE : N'importe quel lot de tampon de lavage concentré 20 X peut être utilisé pour préparer ce réactif sous réserve d'utilisation avant la date de péremption indiquée.
2. **Préparation de la solution de substrat** : Utiliser des récipients en verre ou en plastique parfaitement propres. Avant la fin de la seconde incubation, transférer une quantité **suffisante** de tampon substrat dans un récipient et maintenir le contenu à l'abri de la lumière. **Dissoudre complètement** le nombre approprié de comprimés d'OPD dans le tampon substrat avant utilisation.

   Il faut au moins 20 ml de solution de substrat par plaque de micropuits. Une quantité supplémentaire sera peut-être nécessaire, selon le système de distribution utilisé. Voir les instructions du fabricant à ce propos. Ci-dessous, les directives d'utilisation générale :

Nombre de puits	Nombre de plaques	Nombre de comprimés d'OPD	Tampon substrat (ml)
48	0,5	1	12
96	1	2	24
144	1,5	3	36
192	2	4	48
240	2,5	5	60
288	3	6	72

   La solution de substrat est stable pendant 60 minutes, après l'addition des comprimés d'OPD quand elle est conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou jaune très pâle au moment de l'utilisation. Noter l'heure de l'addition des comprimés d'OPD au tampon substrat et l'heure limite d'utilisation. **Si la solution est nettement jaune, ne pas l'utiliser et recommencer la préparation**.

RECUEIL ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Aucune préparation particulière du patient n'est nécessaire avant le recueil de l'échantillon sanguin. Le prélèvement sanguin doit se faire selon les techniques médicales reconnues. Les plasmas recueillis avec une quantité inadéquate d'anticoagulant ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou les plasmas recueillis avec de l'EDTA, de l'héparine ou du citrate comme anticoagulant peuvent être utilisés et doivent être testés le plus rapidement possible. Ne pas utiliser d'échantillons inactivés à la chaleur. **Ne pas utiliser d'azide pour la conservation des échantillons. Ne pas tester d'échantillon de patient ou de donneur contenant de l'azide. L'azide de sodium gêne l'activité de la peroxydase de raifort.** Le sérum ou le plasma doivent être conservés entre 2 et 8 °C, pendant 7 jours maximum. Au-delà, les échantillons doivent être congelés (-20 °C ou plus froid) pour limiter toute contamination. La conservation des échantillons au congélateur

autodégivrant n'est pas recommandée. Aucun effet n'a été observé sur la réactivité du test ORTHO HBc ELISA Test System quand 12 échantillons faiblement réactifs et 12 échantillons négatifs étaient soumis à cinq cycles de congélation/décongélation. Il est préférable d'utiliser des échantillons limpides non hémolysés. Les précipités dans les échantillons doivent être éliminés par centrifugation.

Tous les échantillons doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux. Pour l'expédition, ils doivent être emballés selon les réglementations nationales en vigueur concernant le transport des agents étiologiques.[14] Des études ont montré que les échantillons doivent être expédiés à température ambiante (37 °C maximum) ou réfrigérés (entre 2 et 8 °C) jusqu'à 6 jours maximum et conservés dès leur arrivée entre 2 et 8 °C. Pour le transport de longue durée (plus de 6 jours), les échantillons doivent être conservés congelés (-20 °C ou plus froid).

MODE OPERATOIRE

Matériel fourni

Test ORTHO HBc ELISA Test System
Coffret de 480 tests (code produit 933245)
Coffret de 2400 tests (code produit 933275)

(Voir la section sur les **REACTIFS** pour la liste complète des composants.)

Matériel requis mais non fourni

1. Micropipette réglable multicanaux de 50 et 200 µl avec une précision de ± 5 % minimum ou tout appareil de distribution équivalent
2. Micropipette fixe ou réglable à canal unique de 10 µl avec une précision de ± 10 % minimum ou tout appareil de dilution équivalent
3. Cônes jetables de 5 à 250 µl ou équivalents
4. Pipette sérologique de taille adéquate ou récipient cylindrique gradué
5. Réservoir pour micropipette multicanaux ou récipient équivalent pour réactif
6. Dispositif de lavage-aspiration multicanaux, capable de distribuer et d'aspirer de 300 à 800 µl par puits. (Voir le manuel d'utilisation pour de plus amples informations techniques.)
7. Lecteur de microplaques à double longueur d'ondes (490 ou 492 nm) avec filtre de référence à 620 ou 630 nm. Si le lecteur ne contient pas de filtre de référence, les surfaces inférieures des micropuits qui sont opaques, rayées ou irrégulières peuvent entraîner des résultats élevés erronés. La linéarité du lecteur doit être d'au moins 0 à 2,5 unités de densité optique. Voir les caractéristiques de l'instrument fournies par le fabricant.
8. Incubateur à 37 °C ± 1 °C (sec ou humide)
9. Eau distillée ou désionisée, eau pour réactif de laboratoire clinique de type I ou II également acceptable (voir la section sur les **PRECAUTIONS D'EMPLOI)**
10. Hypochlorite de sodium à 5,25 % (eau de Javel)
11. Acide sulfurique 4N (H_2SO_4) –Pour déterminer si un autre acide peut être utilisé, préparer la solution de substrat selon les indications fournies à la section **PREPARATION DES REACTIFS**. Ajouter 200 µl de solution de substrat dans trois micropuits, puis 50 µl de H_2SO_4 4N dans les trois micropuits. Lire à la longueur d'ondes de 490 nm ou 492 nm avec un filtre de référence de 620 nm ou 630 nm au temps « 0 » et au temps « 60 minutes ». Chaque densité optique obtenue doit être inférieure ou égale 0,050.
12. Barrettes de micropuits noirs ou puits vierges équivalents
13. Tampon de lavage concentré 20X (code produit 933730, 6 x 150 ml ; code produit 933780, 4 x 450 ml ; code produit 933790, 12 x 450 ml : Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.) – tampon phosphate contenant du chlorure de sodium et un détergent.
    Conservateur : 2-chloroacétamide à 2 %
14. Agitateur de microplaques à vitesse variable (100 à 400 t/mn) quand la distribution des échantillons n'a <u>pas</u> été réalisée avec un pipeteur-dilueur

Procedure

1. Avant le début du test, laisser revenir tous les réactifs du coffret à température ambiante (15 à 30 °C). Homogénéiser doucement le contenu des flacons en les retournant à plusieurs reprises, tout en évitant de les faire mousser. Vérifier la température de l'incubateur et la maintenir à 37 °C ± 1 °C.
2. Evaluer le nombre de puits nécessaire pour la série de tests. En plus des échantillons, compter pour chaque plaque (entière ou partielle) un blanc-substrat, trois contrôles négatifs et deux contrôles positifs. Si la barrette entière n'est pas utilisée, la casser pour obtenir le nombre exact de micropuits nécessaires. Les puits inutilisés doivent être conservés dans le sachet en papier d'aluminium fourni, soigneusement scellé **avec un dessiccateur**, à une température comprise entre 2 et 8 °C, et utilisés dans les 14 jours suivant l'ouverture du sachet. Noter sur le sachet sa date d'ouverture et la date de péremption des puits inutilisés.

   Réaliser le test sur une plaque partielle est possible dans la mesure où les conditions suivantes sont respectées :

   Les barrettes de micropuits de différentes plaques peuvent être utilisées afin de reconstituer une plaque partielle ou complète si les barrettes sont d'un même lot, si les dates de péremption sont respectées et si elles proviennent d'un kit déjà contrôlé.

   Les contrôles doivent être présents sur chaque barrette de micropuits provenant d'un kit récemment entamé et non contrôlé. Ces contrôles sont placés en début de chaque plaque.

   ATTENTION : Manipuler les barrettes de micropuits avec soin. Ne pas toucher la face inférieure externe des puits.
3. Si nécessaire, disposer les barrettes de micropuits dans le support. **Les barrettes doivent être à niveau dans le support.** Si la plaque est incomplète, la compléter avec des puits noirs ou vierges.
4. Enregistrer (sous la forme d'un plan de plaque) la position des contrôles et des échantillons dans les micropuits.

   Disposer les contrôles de manière à avoir le blanc-substrat dans le puits 1A. A partir du puits 1A, disposer de façon horizontale ou verticale les contrôles selon la configuration suivante. La configuration dépend de la programmation informatique.

Puits 1A	Blanc-substrat
	Contrôle négatif
	Contrôle négatif
	Contrôle négatif
	Contrôle positif
	Contrôle positif

5. **Vérifier que les systèmes de distribution manuels utilisés délivrent les volumes spécifiés mentionnés dans le protocole, selon les instructions du fabricant**. Ajouter les contrôles et les échantillons dans les micropuits de la manière suivante :
   a. 200 µl de diluant d'échantillon dans tous les puits, **sauf 1A**.
   b. 10 µl de contrôle ou d'échantillon dans les puits appropriés.
   c. Si les contrôles et les échantillons ont été distribués manuellement, après avoir rempli les micropuits, placer le support de barrettes de micropuits sur un agitateur de microplaques pendant 5 à 10 secondes. L'agitateur doit être utilisé à une vitesse lente ou modérée, en évitant de projeter le contenu des puits.
6. Pour le traitement manuel des plaques, recouvrir le support de micropuits d'un film protecteur. En cas d'utilisation d'un processeur de plaques automatique pour l'incubation, suivre les instructions du fabricant en ce qui concerne la couverture de la plaque. Incuber à 37 °C ± 1 °C pendant 60 minutes ± 5 minutes.
7. Si nécessaire, mettre les barrettes à niveau dans le support. A l'aide d'un dispositif d'aspiration-lavage, aspirer et laver tous les puits **cinq** fois, à l'aide du tampon de lavage (1X).

   ATTENTION : Suivre strictement la procédure de lavage décrite ci-dessous pour assurer un niveau de performance maximum du test. Procéder selon les indications ci-dessous afin d'obtenir un lavage parfait.
   a. Aspirer le contenu des microplaques et remplir avec le tampon de lavage. Eviter tout débordement. Attendre environ 20 secondes entre l'addition du tampon de lavage et l'aspiration suivante.
   b. Répéter la séquence aspiration/remplissage **quatre** fois.
   c. Aspirer complètement le contenu de chaque puits. Si nécessaire, retourner la plaque et tapoter fermement sur une serviette en papier propre afin d'éliminer toute trace de tampon de lavage.
8. Déposer 200 µl de conjugué anticorps dans tous les puits, à **l'exception du puits 1A**.
9. En cas de traitement manuel des plaques de micropuits, recouvrir le support de barrettes de micropuits **d'un film protecteur neuf**. En cas d'utilisation d'un processeur automatique pour l'incubation, suivre les instructions du fabricant en ce qui concerne la couverture de la plaque. Incuber à 37 °C ± 1 °C pendant 60 minutes ± 5 minutes.
10. Préparer une quantité **suffisante** de solution de substrat avant son utilisation indiquée à l'étape 12 afin d'obtenir une **dissolution complète** des comprimés d'OPD. Voir la section **PREPARATION DES REACTIFS**. **N'utiliser qu'une seule préparation de solution de substrat sur une même plaque**.
11. Après la seconde incubation, laver les puits comme lors de l'étape 7.
12. Déposer 200 µl de solution de substrat dans tous les puits, **y compris dans le puits 1A**.
13. Incuber à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 minutes ±1 minute.
14. Déposer 50 µl d'acide sulfurique 4N (H_2SO_4) dans tous les puits, **y compris le puits 1A**. L'acide doit être ajouté en un jet constant et fort pour assurer un bon mélange ou, si nécessaire, les plaques peuvent être tapotées ou agitées sur un agitateur de microplaques. Eviter de projeter le contenu des micropuits. En cas d'utilisation d'un processeur de plaques automatique, suivre les instructions du fabricant pour assurer le mélange de l'acide sulfurique.
15. Si nécessaire, essuyer avec soin le dessous des barrettes de micropuits avec un chiffon absorbant, doux et non pelucheux, avant la lecture. Si nécessaire, mettre les barrettes à niveau dans le support. Lire la microplaque à une longueur d'ondes de 490 nm ou 492 nm. Pour les lectures en double longueur d'ondes, régler la longueur d'ondes de référence sur 620 nm ou 630 nm. Faire le blanc sur le puits 1A, selon les instructions données par le fabricant.

    REMARQUE : La lecture des plaques doit se faire dans les 60 minutes suivant l'addition de l'acide sulfurique 4N. Les plaques doivent être conservées à l'abri de la lumière avant la lecture.

Méthodes de contrôle de qualité[15,16]

1. **Critères d'acceptation du blanc-substrat**

   La plaque est validée par rapport au blanc-substrat si la densité optique obtenue pour le blanc-substrat (puits 1A) est supérieure ou égale à -0,020 et inférieure ou égale à 0,050.
2. **Critères d'acceptation des contrôles négatifs**
   a. La densité optique de chaque contrôle négatif doit être inférieure ou égale à 0,350 et supérieure ou égale à -0,005. Les valeurs situées entre 0,000 et -0,005 compris sont acceptables mais doivent être arrondies à 0,000 pour les calculs. Si l'une des valeurs des trois contrôles négatifs se situe hors de ces limites, recalculer la moyenne des contrôles négatifs (CN) à partir de la valeur des deux contrôles négatifs restants. La plaque est invalide et le test est à recommencer si au moins deux des trois contrôles donnent des valeurs en dehors des limites.
   b. Déterminer la moyenne des contrôles négatifs (CN).
      Exemple:

Contrôle négatif	**Densité optique**
1	0,200
2	0,180
3	0,160

Densité optique totale = 0,540

$$CN = \frac{\text{Densité optique totale}}{3} = 0{,}180$$

3. **Critères d'acceptation des contrôles positifs**

   Le contrôle positif est utilisé pour vérifier la capacité des composants de la trousse à détecter un échantillon positif selon la procédure préconisée par le fabricant.

Une plaque est validée par rapport aux résultats positifs si les densités optiques des deux contrôles positifs sont supérieures ou égales à 0,800, dans la limite de linéarité du lecteur et si la différence de densité optique entre les deux contrôles positifs n'est pas supérieure à 0,500. Tout autre résultat pour le contrôle positif doit être considéré comme erroné.

REMARQUE : Les résultats dépassant la limite supérieure de l'intervalle de linéarité du lecteur de microplaques apparaissent sous la forme suivante : « OVER » ou « *** » ou « > ».

4. **Calcul de la valeur seuil**

   Valeur seuil = CN + 0,400

   Exemple :

Contrôle négatif	Densité optique
1	0,200
2	0,180
3	0,160

Densité optique totale = 0,540

$$CN = \frac{\text{Densité optique totale}}{3} = 0,180$$

Valeur seuil = 0,180 + 0,400 = 0,580

INTERPRETATION DES RESULTATS

1. Les échantillons dont la densité optique est inférieure à -0,005 doivent être retestés dans un seul micropuit. L'échantillon est considéré comme négatif si la nouvelle densité optique est inférieure à la valeur seuil, même si cette valeur reste inférieure à -0,005.
2. Les échantillons dont la densité optique est inférieure à la valeur seuil et supérieure ou égale à -0,005 sont considérés comme négatifs. Il n'est pas nécessaire de procéder à d'autres tests.
3. Les échantillons dont la densité optique est supérieure ou égale à la valeur seuil sont considérés comme initialement positifs et doivent être retestés en double exemplaire avant l'interprétation finale.
4. Après avoir retesté en double exemplaire un échantillon initialement positif, cet échantillon est considéré comme positif de façon répétée pour les anticorps anti-HBc si l'une des valeurs ou les deux est (sont) positive(s), c'est-à-dire supérieure(s) ou égale(s) à la valeur seuil.
5. Après avoir retesté en double exemplaire un échantillon initialement positif pour les anticorps anti-HBc, cet échantillon est considéré comme négatif si les deux valeurs trouvées sont négatives, c'est-à-dire inférieures à la valeur seuil.

LIMITES DE LA METHODE

Le test ORTHO HBc ELISA Test System ne détecte que les anticorps anti-HBc dans le sérum ou le plasma humain. La présence d'anticorps anti-HBc ne constitue pas un diagnostic d'infection par l'hépatite B, mais peut suggérer une infection récente et/ou passée par le virus de l'hépatite B. Un résultat de test négatif n'exclut pas la possibilité d'une exposition au virus de l'hépatite B. Il se peut que les concentrations d'anticorps anti-HBc ne puissent pas être détectées au début de l'infection.

Le contrôle positif utilisé pour ce test n'est pas destiné à évaluer la sensibilité de la méthode. Il sert à vérifier que les composants du coffret sont capables de détecter un échantillon positif, si le protocole a été strictement respecté.

Lorsque les résultats du contrôle positif se situent en dehors de la plage de linéarité du lecteur de microplaques, le contrôle positif ne peut pas être utilisé pour évaluer la précision de la méthode.

RESULTATS ATTENDUS

La fréquence des anticorps anti-HBc dans une population donnée dépend en grande partie des conditions géographiques locales et de la population étudiée. Au cours d'une étude sur des donneurs volontaires, ayant obtenu des résultats négatifs pour HBsAg, 1% des échantillons ont présenté des résultats positifs pour les anticorps anti-HBc.[2]

PERFORMANCES SPECIFIQUES[17]

Réactivité chez des donneurs de sang, supposés en bonne santé

Trois laboratoires cliniques indépendants ont testé un total de 3010 échantillons provenant de donneurs supposés en bonne santé. Les résultats de la réactivité du test ORTHO HBc ELISA Test System sont indiqués au tableau 1.

Parmi les 3010 échantillons testés, 2969 étaient négatifs. Le taux de réactivité répétée du test ORTHO HBc ELISA Test System était de 1,1 % pour cette population à faible fréquence.

Tableau 1 : Détection des anticorps anti-HBc dans le sérum ou le plasma de donneurs de sang supposés en bonne santé

LABORATOIRE	NOMBRE D'ECHANTILLONS TESTES	INITIALEMENT NEGATIFS	INITIALEMENT POSITIFS	POSITIFS DE FACON REPETEE
1	1033	1016 (98,4 %)	17 (1,6 %)	16 (1,5 %)
2	1000	989 (98,9 %)	11 (1,1 %)	7 (0,7 %)
3	977	964 (98,7 %)	13 (1,3 %)	10 (1,0 %)
TOTAL	3010	2969 (98,6 %)	41 (1,4 %)	33 (1,1 %)

Réactivité chez des patients souffrant d'hépatite

Des échantillons provenant de patients souffrant d'une infection aiguë par le virus de l'hépatite B (HBV A), d'une infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV C), d'une infection par le virus de l'hépatite A (HAV), d'une infection par le virus

de l'hépatite non-A non-B (HCV) et d'insuffisance hépatique due à l'alcoolisme (FOIE) ont été testés. Les résultats sont indiqués au tableau 2.

Tableau 2 : Détection des anticorps anti-HBc chez des patients souffrant d'hépatite

GROUPE	NOMBRE D'ECHANTILLONS TESTES	INITIALEMENT NEGATIFS	INITIALEMENT POSITIFS	POSITIFS DE FACON REPETEE
HBV A	25	0	25 (100 %)	25 (100 %)
HBV C	28	0	28 (100 %)	28 (100 %)
HAV	10	8 (80 %)	2 (20 %)	2 (20 %)
HCV	10	8 (80 %)	2 (20 %)	1 (10 %)
FOIE	25	12 (48 %)	13 (52 %)	10 (40 %)

Les deux échantillons HAV qui étaient positifs pour les anticorps anti-HBc étaient également positifs pour les anticorps anti-HBs. La réactivité pour les anticorps anti-HBc des échantillons des groupes HCV et FOIE est probablement due à d'autres facteurs de risque.

RÉSUMÉ DES RÉVISIONS

Section	Révision
Première de couverture	Format de couverture standardisé, y compris l'utilisation de symboles de diagnostic *in vitro*.
RÉACTIFS	Changement du conservateur de conjugué thimérosal à 0,02 % par du ProClin™ 300 à 1 %.
PRÉCAUTIONS D'EMPLOI	Mise à jour de l'OPD et ajout des instructions de sécurité du ProClin™ 300.
ALLEMAND	Retrait de la section en langue allemande.
LÉGENDE	Ajout d'un nouveau tableau de symboles de légende.
Page d'identification d'OCD	Mise à jour du logo de Chiron.
Distribué par	Retrait des pays « Distribué par ».
BIBLIOGRAPHIE	Ajout de l'entrée n°12 dans la bibliographie.

Antigeno core del virus la hepatitis B (recombinante)

ORTHO® HBc ELISA Test System

Inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos frente al antigeno core del virus de la hepatitis B (anti-HBc) en suero o plasma humanos.

NOMBRE Y USO PREVISTO

El Sistema ORTHO ELISA HBc es un ensayo cualitativo de detección de anticuerpos totales frente al antígeno core del virus de la hepatitis B (anti-HBc) en suero o plasma humanos. Está indicado para la selección de sangre y productos derivados destinados a transfusiones sanguíneas y para el diagnóstico de infección actual o pasada por el virus de la hepatitis B.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Después de una infección por el virus de la hepatitis B (HBV) aparecen diversos marcadores serológicos. El primero que aparece suele ser el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). A continuación, aparecen los anticuerpos frente al antígeno del core del virus de la hepatitis B (anti-HBc), que continúa siendo detectable tras la desaparición del HBsAg y hasta la convalecencia. Los anticuerpos frente al antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBs) generalmente aparecen unas semanas después de que se haya eliminado el HBsAg.

La determinación de anti-HBc en suero y plasma puede servir de ayuda para controlar la evolución de la infección por HBV. El anti-HBc aparece en prácticamente todos los individuos infectados con HBV y es un marcador serológico fiable de infección reciente o pasada.[1,2] Durante la fase aguda de la infección por HBV, poco después de la aparición del HBsAg aparece el anti-HBc, que se mantiene aún después de la eliminación del HBsAg.[3] En los casos en que se haya eliminado el HBsAg, pero se haya retrasado la aparición de anti-HBs, es posible que el anti-HBc sea el único marcador serológico de una infección reciente por HBV.[4] Además, e el anti-HBc se encuentra en prácticamente todos los pacientes con hepatitis B crónica.[5]

Los procedimientos del inmunoensayo enzimático (ELISA) permiten la detección rutinaria de anticuerpos frente a antígenos específicos.[6,7] La detección de anti-HBc total tiene valor debido a la asociación entre dichos anticuerpos y las infecciones por HBV.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento del ensayo consta de tres etapas que se llevan a cabo en un micropocillo recubierto con antígeno del core virus de la hepatitis B obtenido por técnicas recombinantes (rHBcAg). El antígeno recombinante usado en este ensayo es fabricado por Chiron Corporation según la correspondiente licencia americana y mediante un acuerdo de fabricación compartida. El antígeno recombinante es producido en *Escherichia coli*.

En la primera etapa, se coloca la muestra a ensayar directamente en un micropocillo que contiene diluyente de muestra, y se incuba durante un período de tiempo determinado. Si hay anti-HBc presentes en la muestra, se formarán complejos antígeno-anticuerpo en la superficie del micropocillo. Si no hay anti-HBc en la muestra, no se formanrán estos complejos y las proteínas no ligadas del suero o del plasma se eliminarán en la fase de lavado.

En la segunda etapa, se añade el conjugado de anticuerpo al pocillo. El conjugado de anticuerpo está constituido por una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos específicos para IgG e IgM humanas, por lo que se se une específicamente a la porción de anticuerpo de los complejos antígeno-anticuerpo. Si no se han formado complejos antígeno-anticuerpo el conjugado no ligado se elimina durante el lavado.

En la tercera etapa, se añade al pocillo un sistema de detección enzimática, compuesto de *o*-fenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Si el conjugado ligado está presente, se oxida el OPD y se produce un compuesto coloreado. Luego se agrega ácido sulfúrico para detener la reacción.

La intensidad del color depende de la cantidad de conjugado ligado; por lo tanto, es función de la concentración del anti-HBc presente en la muestra. La intensidad del color se mide con un lector de microplacas.

REACTIVOS

Componentes del kit de 480 tests (Código de producto 933245)

5 microplacas recubiertas con antígeno core del virus de la hepatitis B (HBcAg) (recombinante) (8 tiras de 12 micropozos en cada soporte)

1 frasco de conjugado de anticuerpo (monoclonal murino) (125 mL): mezcla de anti-IgG humana y anti-IgM humana conjugados con peroxidasa de rábano y que contiene estabilizadores de proteinas
Conservante: ProClin™ 300 al 1%

1 frasco de diluyente de muestra (150 mL): solución salina tamponada con fosfato y con estabilizadores de proteinas
Conservante: timerosal al 0,02%

1 vial de pastillas de OPD (30 pastillas): contiene *o*-fenilendiamina•2HCl

1 frasco de Tampón Substrato (190 mL): tampón citrato-fosfato con peróxido de hidrógeno al 0,02%
Conservante: timerosal al 0,01%

1 vial de control positivo (humano) (1,0 mL)
Origen: Suero o plasma humano con anti-HBc, pero no reactivo ni para el HBsAg, ni para el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y tipo 2 (HIV-2)
Conservante: timerosal al 0,02%

2 viales de control negativo (humano) (1,0 mL cada uno)
Origen: Suero humano no reactivo para el anti-HBc , ni para HBsAg, ni para el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y tipo 2 (HIV-2)
Conservante: timerosal al 0,02%

21 etiquetas adhesivas desechables para microplacas

Componentes del kit de 2400 tests (Código de producto 933275)

25 microplacas recubiertas con antígeno core del virus de la hepatitis B (HBcAg) (recombinante) (8 tiras de 12 micropozos en cada soporte)

5 frascos de conjugado de anticuerpo (monoclonal murino) (125 mL cada uno): mezcla de anti-IgG humana y anti-IgM humana conjugados con peroxidasa de rábano y que contiene estabilizadores de proteinas
Conservante: ProClin™ 300 al 1%

5 envases de diluyente de muestra (150 mL cada uno): solución salina tamponada con fosfato, con estabilizantes proteicos
Conservante: timerosal al 0,02%

3 viales de pastillas de OPD (30 pastillas cada uno): contiene *o*-fenilendiamina•2HCl

5 frascos de tampón substrato (190 mL cada uno): tampón citrato-fosfato con peróxido de hidrógeno al 0,02%
Conservante: timerosal al 0,01%

4 viales de control positivo (humano) (1,0 mL cada uno)
Origen: Suero o plasma humano con anti-HBc, pero no reactivo para el HBsAg, ni para el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y tipo 2 (HIV-2)
Conservante: timerosal al 0,02%

5 viales de control negativo (humano) (1,0 mL cada uno)
Origen: Suero humano no reactivo para el anti-HBc, ni para HBsAg, ni para el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y tipo 2 (HIV-2)
Conservante: timerosal al 0,02%

84 etiquetas adhesivas desechables para microplacas

ATENCIÓN: MANIPULAR COMO SI FUERA POTENCIALMENTE INFECCIOSO.

Almacenar entre 2° y 8°C

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

El Sistema de ensayo ELISA ORTHO para HBc cumple con los requisitos del Panel de Referencia de la FDA (Oficina de Drogas y Alimentos de EE.UU.) para anticuerpos frente al antígeno core del virus de la hepatitis B.

PRECAUCIONES

1. ATENCIÓN: Algunos componentes de este kit contienen derivados de sangre humana. No hay ningún método de análisis conocido que pueda ofrecer la garantía absoluta de que los productos fabricados a partir de la sangre humana no transmitian infecciones. Por lo tanto, hay que considerar que todos los productos fabricados a partir de la sangre son potencialmente infecciosos. Se recomienda la manipulación de estos reactivos y muestras humanas de acuerdo con pautas establecidas de buenas prácticas de trabajo de laboratorio.[8,9]
2. Utilice guantes desechables cuando manipule muestras y reactivos del kit. Después quítese los guantes y lávese las manos muy bien.
3. Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.
4. Deseche todos los materiales usados para el análisis y todas las muestras como si fueran agentes infecciosos. La eliminación de todos los materiales y las muestras debe hacerse de acuerdo con los reglamentos locales, estatales y federales para la eliminación de desechos.[10,11]
5. El ácido sulfúrico 4N (H_2SO_4) es un ácido fuerte. Si se derrama limpie la zona inmediatamente con agua. Si el ácido entra en contacto con la piel o los ojos, lávelos con cantidades abundantes de agua y consulte a un médico.
6. Manipule las pastillas de OPD con pinzas de plástico o Teflón®. Las pinzas metálicas pueden reaccionar con las pastillas e interferir con los resultados del análisis.
7. Evitar que el OPD entre en contacto con ojos, piel o vestimenta, puesto que puede causar irritación o una reacción cutánea alérgica. En la eventualidad de que OPD entre en contacto con la piel, lavar con agua abundante. Es tóxico por inhalación, ingestión y contacto con la piel. En caso de malestar general, acudir al médico. A continuación se indican los requisitos aplicables sobre riesgos y seguridad.[12]

   N,R: 20/21-25-36-40-43-50/53-68 - Nocivo por inhalación y en contacto con la piel. Tóxico por ingestión. Irrita los ojos. Posibles efectos cancerígenos. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. Posible riesgo de efectos irreversibles.
   S: 26-28-36/37-45-60-61 - En caso de contacto con los ojos, lávelos inmediatamente con abundante agua y acuda al médico. En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua. Utilize indumentaria y guantes de protección adecuados. En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (si es posible, muestre la etiqueta). Este producto y su recipiente deben ser eliminados como residuos peligrosos. Evite su vertido al medio ambiente. Consulte las instrucciones especiales y las fichas de datos de seguridad.
8. Las pastillas de OPD son sensibles a la luz y a la humedad. Mantenga el vial **herméticamente cerrado** cuando no lo esté usando. **Deje que el vial alcance la temperatura ambiente (15° a 30°C) antes de abrirlo**. La bolsa con desecante debe estar dentro del vial en todo momento. No use las pastillas que estén amarillas o rotas.
9. Use agua destilada o desionizada para preparar la solución de tampón de lavado. El agua tipo I o tipo II para reactivos de laboratorio clínico es aceptable.[13]

   Almacene el agua en recipientes no metálicos.
10. No mezcle los reactivos de kits que tengan distinto número de lote. Se puede usar cualquier lote de tampón de lavado concentrado 20X, siempre que no haya pasado la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
11. Todos los reactivos y componentes deben estar a temperatura ambiente antes utilizarlos y los componentes del kit deben almacenarse entre 2° y 8°C después de su uso.

12. Las tiras de pocillos están en bolsas de protección selladas que contienen un desecante indicador de humedad. El desecante normalmente tiene un color azul-morado, pero se vuelve rosado si hay humedad en la bolsa, por tanto, si el desecante tiene color rosado no utilice las tiras de pocillos.
13. No use los reactivos después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
14. La contaminación cruzada entre reactivos anula la validez de los resultados del ensayo, por lo que se recomienda usar recipientes etiquetados y exclusivos para cada reactivo.
15. Asegúrese de dispensar la muestra en el pocillo, ya que si no añade la muestra, el resultado indicará que no hubo reacción y podría ser erróneo.
16. Cuando use una micropipeta de canal único para dispensar las muestras a mano, use una punta de pipeta nueva para cada muestra analizada. Cuando use una micropipeta multicanal, use puntas nuevas para la dispensación de cada reactivo.
17. Es esencial cumplir estrictamente el procedimiento de lavado, para asegurar un rendimiento óptimo del análisis (vea el paso 7 del **Procedimiento del ensayo).**
18. No permita que se sequen los pocillos una vez que ha comenzado el análisis.
19. No toque la superficie externa del fondo de los pocillos. Las huellas dactilares o rayas podrían interferir con la lectura de los pocillos.
20. Asegure que los pocillos estén nivelados dentro de su soporte durante el ensayo. Si fuera necesario, limpie el fondo de las tiras de pocillos cuidadosamente con un paño absorbente suave y sin pelusa, para eliminar la humedad, polvo o residuos, antes de la lectura.
21. Si los valores de los controles negativos o positivos están fuera de los límites esperados (consulte la sección **Procedimientos de control de calidad),** podría ser debido a un problema en el procedimiento seguido o al deterioro de los reactivos.
22. No permita que los vapores de hipoclorito sódico, procedentes del blanqueador de cloro o de alguna otra fuente, entren en contacto con las tiras de pocillos durante el ensayo, porque se podría inhibir la reacción colorimétrica.
23. Todo el equipo para pipetear debe usarse con cuidado, calibrarse periódicamente y hacer su mantenimiento de acuerdo con las instrucciones del fabricante del equipo.
24. El lector de microplacas debe tener un filtro de referencia con un ajuste a 620 ó 630 nm. Si usa un instrumento sin filtro de referencia, las zonas del fondo de los micropozos que estén opacas o rayadas podrían dar lugar a lecturas elevadas.
25. Es posible que aparezcan cristales en el Diluyente de Muestra tras un período de almacenamiento en nevera. Para disolver estos cristales, retire el diluyento de muestra de la nevera y deje que alcance la temperatura ambiente, inviertiendo el envase periodicamente. Si tras este proceso, se mantienen los cristales en el diluyente, no lo utilice.
26. El conjugado de reactivo incluye ProClin™ 300 como conservante. A continuación se indican los requisitos aplicables sobre riesgos y seguridad.[12]

    R: 36/38–43 - Irrita los ojos y la piel. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.
    S: 23–24/25 - No respirar los vapores/aerosoles. Evítese el contacto con los ojos y la piel.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. **Preparación del tampón de lavado (1X):** Mezcle 50 mL de tampón de lavado concentrado 20X con 950 mL de agua destilada o desionizada. El tampón de lavado (1X) es estable durante 30 días si se almacena a temperatura ambiente. Para un almacenamiento más prolongado (hasta 60 días), manténgalo entre 2° y 8°C. Anote en el recipiente la fecha de preparación del tampón de lavado (1X) y su fecha de caducidad. Deseche el tampón de lavado (1X) si hay señales visibles de contaminación.

   NOTA: Este reactivo se puede preparar con tampón de lavado concentrado 20X de cualquier número de lote, siempre que no haya pasado su fecha de caducidad.

2. **Preparación de la solución de substrato:** Use recipientes limpios de vidrio o de plástico. Antes del final de la segunda incubación, coloque una cantidad suficiente de tampón substrato en un recipiente y póngalo en la oscuridad. Añada el número adecuado de pastillas de OPD en el tampón substrato y disuélvalas completamente antes de su utilización.

   Cada microplaca requiere al menos 20 mL de solución de substrato. Es posible que se necesite más solución de substrato dependiendo del dispensador de reactivo que se utilice. Consulte las instrucciones del fabricante del instrumento si necesita reactivo adicional. A continuación figuran las pautas de uso general.

N° de pocillos	N° de placas	N° de pastillas de OPD	Tampón substrato (mL)
48	0,5	1	12
96	1	2	24
144	1,5	3	36
192	2	4	48
240	2,5	5	60
288	3	6	72

Tras la adición de las pastillas de OPD, la solución de substrato es estable durante 60 minutos, si se mantiene a temperatura ambiente y en la oscuridad. En el momento de utilizarla debe ser incolora o de color amarillo muy pálido. Anote en el recipiente la hora de preparación del tampón substrato y la hora de caducidad de la solución. Si la solución tiene un color notoriamente amarillo, deséchela y prepare una nueva solución de substrato.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

No es necesaria ninguna preparación especial del paciente antes de la obtención de la muestra de sangre. La sangre debe extraerse mediante técnicas médicas aprobadas. No use plasma obtenido con una relación muestra:anticoagulante inadecuada. Se puede usar suero, o plasma de muestras obtenidas con EDTA, heparina o anticoagulantes basados en citrato. **No use muestras tratadas con calor. No use azida sódica como conservante de las muestras, ni analice muestras de pacientes o donantes que contengan azida, porque inhibe la actividad de la peroxidasa de rábano.** El suero o el plasma se pueden almacenar entre 2° y 8°C hasta por un máximo de 7 días. Si necesita un almacenamiento más prolongado,

conserve las muestras congeladas (a -20°C o menos) para reducir la posibilidad de contaminación. No se recomienda conservar las muestras en congeladores con ciclo de descongelación automático. No hubo ningún efecto sobre la reactividad con el Sistema de prueba ELISA ORTHO para HBc cuando se analizaron 12 muestras débilmente reactivas y 12 muestras no reactivas después de cinco ciclos de congelación y descongelación. Es preferible usar muestras transparentes y no hemolizadas. Elimine los precipitados mediante la centrifugación de las muestras.

Manipule todas las muestras como si fueran a transmitir agentes infecciosos. Si es necesario enviar las muestras a otro lugar, envíaselas de acuerdo con los reglamentos federales concernientes al transporte de agentes etiológicos.[14] Diversos estudios han demostrado que las muestras se pueden transportar a temperatura ambiente (hasta 37°C) o refrigeradas (2° a 8°C) hasta por un máximo de 7 días, y luego almacenarse entre 2° y 8°C. Si el envío involucra un transporte muy largo (más de 7 días), mantenga las muestras congeladas (a -20°C o menos).

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

ORTHO HBc ELISA Test System
Kit de 480 tests (Código de producto 933245)
Kit de 2400 tests (Código de producto 933275)

(Vea la lista completa en la sección **REACTIVOS**)

Material necesario no suministrado

1. Micropipeta multicanal, capaz de dispensar 50 µL y 200 µL con una exactitud de al menos ± 5%, o algún sistema equivalente para dispensar los reactivos.
2. Micropipeta monocanal fija o ajustable, capaz de dispensar 10 µL con una exactitud de al menos ± 10%, o algún aparato equivalente para diluir las muestras.
3. Puntas de pipeta de 5 µL a 250 µL desechables, o su equivalente.
4. Pipeta serológica o probeta graduada de tamaño apropiado.
5. Recipiente para micropipeta de canales múltiples o recipiente equivalente para reactivos.
6. Lavador de microplacas, capaz de dispensar y aspirar de 300 µL a 800 µL por pocillo. Para conseguir más información técnica, consulte el manual del operador del equipo.
7. Lector de microplacas de dos longitudes de onda, capaz de leer a 490 nm o 492 nm con un filtro de referencia de 620 nm o 630 nm. Si se utiliza un instrumento sin filtro de referencia, las zonas del fondo de los pocillos que estén opacas o rayadas podrían dar lugar a lecturas elevadas. La linealidad de un lector de microplacas debe cubrir al menos de 0 a 2,5 unidades de absorbancia. Consulte las especificaciones del fabricante del instrumento.
8. Incubador de 37°C ± 1°C (seco o humidificado).
9. Es aceptable usar agua destilada o desionizada, o agua tipo I o tipo II para reactivos de laboratorio clínico. (Vea la sección **PRECAUCIONES**).
10. Hipoclorito sódico al 5,25% (lejía comercial).
11. Acido sulfúrico 4N (H_2SO_4): disponible en España a través de Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Código de producto 40011) o equivalente. Para determinar si el ácido sulfúrico de otro fabricante es apropiado, prepare la solución de substrato como se describe en la sección **PREPARACIÓN DE REACTIVOS**. Agregue 200 µL de solución de substrato a tres pocillos y luego agregue a cada uno 50 µL del H_2SO_4 4N de prueba. Lea los pocillos a una longitud de onda de 490 nm o 492 nm con un filtro de referencia de 620 nm o 630 nm a "0 minutos" y a "60 minutos". Todos los valores de absorbancia para cada intervalo de tiempo deben ser iguales a 0,050 o menos.
12. Tiras de pocillos negras (Código de producto 651-20-003-1: Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.) o pocillos sin revestimiento.
13. Tampón de lavado concentrado 20X (Código de producto 933730, 6 x 150 mL; Código de producto 933780, 4 x 450 mL; Código de producto 933790, 12 x 450 mL; de Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.): tampón fosfato con cloruro sódico y detergente.
    Conservante: 2-cloroacetamida al 2%.
14. Agitador de microplaca, de velocidad variable entre 100 y 400 rpm. Para utilizar cuando la dispensación de muestras no se realice con un pipeteador-diluidor.

Procedimiento del ensayo

1. Antes de comenzar el ensayo , deje que los componentes del kit alcancen temperatura ambiente (15° a 30°C). Invierta los reactivos suavemente varias veces y procure no formar espuma. Revise la temperatura del incubador y manténgala a 37°C ± 1°C.
2. Determine el número total de micropozos que necesita para el ensayo. Además de las muestras, debe usar un blanco de substrato, tres controles negativos y dos controles positivos en cada placa o placa parcial. Si no se necesita la microplaca entera, puede dividirse para conseguir el número apropiado de pocillos. Las tiras de pocillos no usadas deben almacenarse entre 2 y 8°C en la bolsa de papel aluminio suministrada, herméticamente sellada y **con desecante**, y deben usarse dentro de los 14 días después de abrir la bolsa. Anote en la bolsa la fecha en que se abrió y la fecha de caducidad de los pocillos no usados.

   Es posible realizar el ensayo en una microplaca que no esté completa, siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

   Se combinen tiras de pocillos procedentes de diferentes microplacas, pero que correspondan al mismo lote, no hayan pasado la fecha de caducidad de la bolsa y procedan de placas que previamente hayan demostrado una respuesta apropiada a los controles del kit.

   Cuando ensamble una microplaca con tiras de pocillos de una placa recién abierta y aun sin probar, coloque una de estas tiras al principio de la placa y añada todos los controles del kit.

   ATENCIÓN: Manipule las tiras de pocillos con cuidado. No toque la superficie externa del fondo de los pocillos.
3. Ensamble las tiras en su soporte. Las tiras deben estar niveladas dentro del soporte. Si la placa está incompleta, agregue tiras de pocillos negros o sin revestimiento.

4. Prepare un registro (mapa de la placa) que identifique la posición de los controles y las muestras en los pocillos. Organice los pocillos de control de la prueba de manera que el micropozo 1A sea el blanco de substrato y acontinuación coloque todos los controles en una configuración horizontal o vertical. La configuración elegida depende del software.

Pocillo 1A	Blanco de substrato
	Control negativo
	Control negativo
	Control negativo
	Control positivo
	Control positivo

5. **Verifique que todos los equipos para la dispensación manual estén ajustados para agregar los volúmenes que se indican en el procedimiento, de acuerdo con las instrucciones del fabricante del equipo.** Agregue los controles y las muestras a los pocillos como se indica a continuación:
   a. 200 µL de Diluyente de Muestra a todos los pocillos, **excepto el 1A**.
   b. 10 µL de controles o muestras a los pocillos correspondientes.
   c. Si ha colocado manualmente los controles y las muestras, llene los pocillos y luego coloque la microplaca en un agitador, para que se mezcle entre 5 y 10 segundos. Use el agitador a velocidad baja o moderada, y procure no salpicar el contenido de los pocillos de prueba.
6. Para técnica manual, cubra la placa con un adhesivo. Cuando use un procesador de microplaca automatizado para la incubación, siga las recomendaciones del fabricante en cuanto al sellado de la microplaca. Incube a 37°C ± 1°C durante 60 minutos ± 5 minutos.
7. Nivele las tiras en su soporte, si fuera necesario. Use un dispositivo de aspiración y lavado para aspirar y luego lavar todos los pocillos **cinco** veces con el tampón de lavado (1X).

   ATENCIÓN: Para asegurar un rendimiento óptimo del ensayo, es muy importante ceñirse estrictamente al procedimiento de lavado. Siga los pasos especificados para asegurar un lavado a fondo.

   a. Aspire las soluciones de muestra de los micropozos y luego llénelos completamente con el tampón de lavado. No deje que los micropozos rebosen. Deje pasar unos 20 segundos entre la adición del tampón de lavado y la aspiración siguiente.
   b. Complete la secuencia de aspiración y llenado **cuatro** veces más.
   c. Aspire los pocillos por completo. Invierta la placa sobre un papel de filtro limpio y golpéela para eliminar el exceso de tampón de lavado, si fuera necesario.
8. Añada 200 µL de conjugado de anticuerpo a todos los pocillos, **excepto el 1A**.
9. Para procesar las placas a mano, cubra el soporte de las tiras de micropozos con **un nuevo adhesivo de placa**. Cuando use un procesador de microplacas automatizado para la incubación, siga las recomendaciones del fabricante con respecto al sellado de la placa. Incube a 37°C ± 1°C durante 60 minutos ± 5 minutos.
10. Prepare una cantidad **suficiente** de solución de substrato antes del paso 12, con tiempo suficiente para permitir **la disolución completa** de las pastillas de OPD. Consulte la sección **PREPARACIÓN DE REACTIVOS. No utilice más de una solución de substrato para cada microplaca.**
11. Después de la segunda incubación, lave los pocillos como se describe en el paso 7.
12. Dispense 200 µL de solución de substrato a todos los pocillos, **incluyendo el 1A.**
13. Incube a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 30 minutos ± 1 minuto.
14. Añada 50 µL de ácido sulfúrico 4N (H_2SO_4) a todos los pocillos, **incluido el 1A**, con suficiente fuerza como para asegurar una mezcla adecuada Si fuera necesario, golpee la placa suavemente o use un agitador de microplacas para mezclar el contenido, pero procure no salpicar el contenido de los micropozos. Cuando use un procesador de microplacas automatizado, siga las instrucciones del fabricante del instrumento con respecto a la mezcla.
15. Si fuera necesario, limpie el fondo de las tiras cuidadosamente con un paño absorbente suave y sin pelusa, para eliminar la humedad antes de la lectura. Nivele las tiras dentro del soporte. Lea la microplaca a una longitud de onda de 490 nm o 492 nm. Para los lectores de doble longitudes de onda, fije la longitud de onda de referencia en 620 nm o 630 nm. Uilice el micropocillo 1A como blanco para el lector, de acuerdo con las instrucciones del fabricante del instrumento.

    NOTA: Lea las placas de tiras de micropozos antes de 60 minutos después de agregar el ácido sulfúrico 4N. Guarde las placas en las oscuridad hasta el momento de su lectura.

Procedimientos de control de calidad[15,16]

1. **Criterio de aceptación del blanco de substrato**

   Una placa se considera válida, con respecto al blanco, si el valor de absorbancia del blanco de substrato (micropozo 1A) está comprendido entre -0,020 y 0,050.
2. **Criterio de aceptación del control negativo**
   a. Cada control negativo debe tener un valor comprendido entre -0,005 y 0,350. Los números entre 0,000 y -0,005, inclusive, son válidos y deben redondearse a 0,000 para hacer los cálculos. Si una de las lecturas de los tres controles negativos está fuera de estos límites, vuelva a calcular la media del control negativo ($\overline{CNx}$) con los dos valores de control aceptables. Si dos o más de los tres valores de control están fuera de estos límites, la placa no es válida y debe repetirse la prueba.

b. Determine la media de los controles negativos ($CN\bar{x}$).

Ejemplo:

Control negativo	Absorbancia
1	0,200
2	0,180
3	0,160

Absorbancia total = 0,540

$$CN\bar{x} = \frac{\text{Absorbancia total}}{3} = 0{,}180$$

3. **Criterios de aceptación del control positivo**

El control positivo se emplea para verificar que los componentes del kit son capaces de detectar una muestra reactiva, siempre que se cumpla estrictamente con el procedimiento del ensayo.

Una placa se considera válida con respecto al control positivo si las lecturas de ambos controles positivos cumple los siguientes criterios:

a. son iguales o mayores que **0,800**

b. están dentro de los límites de lectura lineal del lector de microplacas

c. no difieren entre sí más de **0,500**

Si el control positivo tiene algún otro valor, no es válido.

NOTA: Los resultados que excedan el límite superior del rango de linealidad del lector de microplacas podrían interpretarse como "OVER" ("exceso") o "***" o ">".

4. **Cálculo del valor de corte (cut-off)**

Valor de corte = $CN\bar{x}$ + 0,400

Ejemplo:

Control negativo	Absorbancia
1	0,200
2	0,180
3	0,160

Absorbancia total = 0,.540

$$CN\bar{x} = \frac{\text{Absorbancia total}}{3} = 0{,}180$$

Valor de corte (cut-off) = 0,180 + 0,400 = 0,580

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Las muestras que tengan una absorbancia menor que -0,005 deben repetirse en un solo pocillo. La muestra se considera no reactiva si la absorbancia en el nuevo ensayo es menor que el valor de corte (cut-off), aunque la absorbancia siga menor que -0,005.
2. Las muestras que tengan una absorbancia menor que el valor de corte (cut-off) e igual o mayor que -0,005 se consideran no reactivas y no es necesario volver a analizarlas.
3. Las muestras con absorbancias iguales o mayores que el valor de corte (cut-off) se consideran inicialmente reactivas y debe repetirse su análisis por duplicado antes de hacer una interpretación final.
4. Si al repetir el ensayo de una muestra, que inicialmente haya dado reacción positiva, y los resultados por duplicado son positivos para una de las determinaciones o para ambas (es decir, valor igual o mayor que el valor de corte), se considera que la muestra es repetidamente reactiva para el anti-HBc.
5. Si al volcer a analizar una muestra que inicialmente haya dado reacción positiva, los resultados por duplicado son ambos negativos (es decir, valores menores que el valor de corte), la muestra se considera no reactiva para el anti-HBc.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

ORTHO Hbc ELISA Test System está limitado a la detección de anti-HBc en suero o plasma humanos. La presencia de anti-HBc no constituye un diagnóstico de infección por hepatitis B pero sí podría indicar una infección reciente o anterior producida por el virus de la hepatitis B. Un resultado no reactivo en el análisis no excluye la posibilidad de exposición al virus de la hepatitis B, ya que al inicio de la infección, las concentraciones de anti-HBc podrían estar por debajo del límite de detección.

El control positivo en el kit de prueba no debe usarse para la determinación cuantitativa de la sensibilidad del ensayo. El control positivo se usa para verificar que los componentes del kit son capaces de detectar una muestra reactiva, siempre que se haya cumplido estrictamente con el procedimiento del test.

Si los valores del control positivo están fuera del rango de linealidad del lector de microplacas, no se puede usar el control positivo para evaluar la precisión del análisis.

RESULTADOS ESPERADOS

La frecuencia de anti-HBc en una población varía mucho según la región geográfica y la población estudiada. En un estudio de donantes voluntarios de sangre , que dieron resultados negativos para HBsAg, se encontró que el 1% dió reacción positiva para anti-HBc.[2]

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL RENDIMIENTO[17]

Reactividad en donantes de sangre supuestamente sanos

Tres estudios clínicos independienes se analizaron un total de 3010 muestras de donantes de sangre presumiblemente sanos. Los resultados de la reactividad con ORTHO Hbc ELISA Test System se muestran en la Tabla 1.

Se analizó un total de 3010 muestras, de las cuales 2969 fueron no reactivas. En esta población de baja prevalencia, la tasa de reactividad positiva del Sistema de prueba ELISA ORTHO para Hbc fue del 1,1%.

Tabla 1: Detección de anti-HBc en suero y plasma de donantes de sangre supuestamente sanos

LUGAR	N° MUESTRAS ANALIZADAS	INICIALMENTE NO REACTIVAS	INICIALMENTE REACTIVAS	REPETIDAMENTE REACTIVAS
1	1033	1016 (98,4%)	17 (1,6%)	16 (1,.5%)
2	1000	989 (98,9%)	11 (1,1%)	7 (0,7%)
3	977	964 (98,7%)	13 (1,3%)	10 (1,0%)
TOTAL	3010	2969 (98,6%)	41 (1,4%)	33 (1,1%)

Reactividad en pacientes con hepatitis

Se analizaron muestras de pacientes con infección aguda por hepatitis B (HBV A), infección crónica por hepatitis B (HBV C), infección por hepatitis A (HAV), hepatitis no A, no B (HCV), y hepatopatía alcohólica (HÍGADO). Los resultados aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2: Detección de anti-HBc en pacientes con hepatitis

GRUPO	N° MUESTRAS ANALIZADAS	INICIALMENTE NO REACTIVAS	INICIALMENTE REACTIVAS	REPETIDAMENTE REACTIVAS
HBV A	25	0	25 (100%)	25 (100%)
HBV C	28	0	28 (100%)	28 (100%)
HAV	10	8 (80%)	2 (20%)	2 (20%)
HCV	10	8 (80%)	2 (20%)	1 (10%)
HÍGADO	25	12 (48%)	13 (52%)	10 (40%)

Las dos muestras HAV que fueron reactivas para anti-HBc también lo fueron para anti-HBs. La reactividad anti-HBc en las muestras de pacientes con HCV o enfermedad hepática probablemente se debió a otros factores de riesgo.

RESUMEN DE REVISIONES

Sección	Revisión
Portada	Formato de portada estandarizado con uso de símbolos IVD.
REACTIVOS	Conservante de conjugado cambiado de timerosal al 0,02% a ProClin™ 300 al 1%.
PRECAUCIONES	Información de seguridad actualizada para OPD y añadida para ProClin™ 300.
ALEMÁN	Eliminada la sección en lengua alemana.
GLOSARIO	Añadida una nueva tabla de símbolos de glosario.
Página de identificación de OCD	Logotipo de Chiron actualizado.
Distribuido por	Países eliminados de la sección “Distribuido por”.
BIBLIOGRAFÍA	Añadida una entrada bibliográfica, la n° 12.

BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA

1. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF. Antibody to hepatitis-B-virus core in man. Lancet 1973;2:869-73.
2. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Ni LY, Barker LF. Antibody to hepatitis-B core antigen: a sensitive indicator of hepatitis B virus replication. N Engl J Med 1974;290:1336-40.
3. Krugman S, Overby LR, Mushahwar IK, Ling C-M, Frosner GG, Deinhardt F. Viral hepatitis, type B: studies on natural history and prevention reexamined. N Engl J Med 1979;300:101-6.
4. Hoofnagle JH, Seef LB, Bales ZB, Zimmerman HJ. Veterans Administration Hepatitis Cooperative Study Group. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. N Engl J Med 1978;298:1379-83.
5. Gerety RJ. Hepatitis B core antigen and antibody (HBcAg/anti-HBc). In: Gerety RJ, ed. Hepatitis B. New York: Academic Press, 1985:27-43.
6. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem 1971;8:871-4.
7. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In: Rose NR, Friedman H, eds. Manual of clinical immunology. 1st ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1976:506-12.
8. Centers for Disease Control. Update: Universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. MMWR 1988;37(24);377-87.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Proposed guideline: Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood and tissue. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987;7(9). (NCCLS document M29-P)
10. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. Appl Environ Microbial 1981;42:762-7.
11. Bond WW, Favero MS, Peterson NJ, Ebert JW. Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high-level disinfectant chemicals. J Clin Microbiol 1983;18:535-8.
12. Commission Directive 2001/60/EC of 7 August 2001 adapting to technical progress Directive 1999/45/EC of the European Parliament and of the Council concerning the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the classification, packaging and labelling of dangerous preparations.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Approved guideline: Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. 2nd ed. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1991;11(13). (NCCLS document C3-A2; ISBN1-562328-127-X)
14. Interstate Shipment of Etiologic Agents, 42 CFR Part 72.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Proposed guideline: Specifications for immunological testing for infectious diseases. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1991;11(9). (NCCLS document I/LA 18-P)
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved guideline: Internal quality control testing: principles and definition. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990. (NCCLS document C24-A)
17. Data on file with Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey.

KEY TO SYMBOLS / LÉGENDE DES SYMBOLES / CLAVE DE LOS SÍMBOLOS

The following symbols may have been used in the labeling of this product. / Les symboles suivants ont pu être utilisés sur l'étiquette de ce produit. / Los siguientes símbolos pueden haber sido empleados en el etiquetado de este producto.

Do Not Reuse / Ne pas réutiliser / No reutilizar

Use by or Expiration Date (Year-Month-Day) / À utiliser avant la date de péremption (année-mois-jour) / Usar antes de o Fecha de caducidad (año-mes-día)

LOT

Lot Number / Numéro de lot / Número de lote

SN

Serial Number / Numéro de série / Número de serie

REF

Catalog Number or Product Code / Référence catalogue ou code produit / Referencia de catálogo o Código del producto

Attention: See Instructions for Use / Attention : consulter le feuillet technique / Atención: Consultar las instrucciones de uso

Manufacturer / Fabricant / Fabricante

EC REP

Authorized Representative in the European Community / Mandataire dans l'Union européenne / Representante autorizado en la Unión Europea

Σ n

Contains Sufficient for "n" Tests / Suffisant pour << n >> dosages / Contiene suficiente para "n" ensayos

IVD

In vitro Diagnostic Medical Device / Pour diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro

Upper Limit of Temperature / Conserver à une température égale ou inférieure à / Límite superior de temperatura

Lower Limit of Temperature / Conserver à une température égale ou supérieure à / Límite inferior de temperatura

Temperature Limitation / Conserver à une température comprise entre / Limitación de temperatura

i n

Consult Instructions for Use, "n" Version / Consultez le feuillet technique << n >> version / Atención: ver las instrucciones de uso "n" versión

Biological Risks / Risques biologiques / Riesgos biológicos

Do not use if damaged / Ne pas utiliser si endommagé / No usar si está dañado

i

Irritant / Irritant / Irritante

Xn

Harmful / Nocif / Nocivo

T

Toxic / Toxique / Tóxico

KEY TO SYMBOLS / LÉGENDE DES SYMBOLES / CLAVE DE LOS SÍMBOLOS

Continued / Suite / Continuación

Dangerous for the Environment / Dangereux pour l'environnement / Peligroso para el medio ambiente

Fragile, Handle with Care / Attention, fragile / Frágil; manipular con cuidado

Keep Dry / Tenir au sec / Mantener seco

This end up / Haut / Este lado hacía arriba

CONTROL +

Positive Control / Contrôle positif / Control positivo

CONTROL −

Negative Control / Contrôle négatif / Control negativo

CALIBRATOR +

Positive Calibrator / Calibrateur positif / Calibrador positivo

CALIBRATOR −

Negative Calibrator / Calibrateur négatif / Calibrador negativo

Confirmatory Control

Confirmatory Control / Contrôle de confirmation / Control de confirmación

Recombinant Antigens Provided by

Recombinant Antigens Provided by / Antigènes recombinants fournis par / Antígenos recombinantes suministrados por

Antibody to Hepatitis B Surface Antigen

Antibody to Hepatitis B Surface Antigen / Anticorps dirigé contre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B / Anticuerpo frente al antígeno de superficie de la hepatitis B

Antibody to Hepatitis B Surface Antigen: Peroxidase Conjugate Concentrate

Antibody to Hepatitis B Surface Antigen: Peroxidase Conjugate Concentrate / Anticorps dirigé contre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B : conjugué concentré à la peroxydase / Anticuerpo frente al antígeno de superficie de la hepatitis B: concentrado de conjugado a peroxidasa

Der Grüne Punkt (the Green Dot). Manufacturer follows certain packaging material waste disposal management regulations. / Der Grüne Punkt (Point Vert). Le fabricant suit certaines règles de mise au rebut pour les déchets des matériaux d'emballage / Punto Verde (der grüne Punkt). El fabricante sigue la regulación sobre gestión de residuos de los embalajes