

HCV Ab

Anticuerpos Contra el Virus de la Hepatitis Tipo C (Elisa)

Uso:

Inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos contra el Virus de la Hepatitis Humana Tipo C (HCV).

Resumen:

El virus de la hepatitis C (VHC), que anteriormente se describía como la forma de transmisión parenteral de la hepatitis no A, no B (NANBH)¹, se convierte en una enfermedad crónica en el 50% de los casos.² El HCV también puede transmitirse a través de fármacos intravenosos, abuso, contacto sexual y en el hogar.³ El virus de la hepatitis C es un virus de ARN monocatenario con algunas relaciones estructurales con la familia de los flavivirus. Las secuencias de ácido nucleico de los clones de ADNc del HCV proporcionaron la base para la construcción de péptidos recombinantes que representan las proteínas putativas del virus de la hepatitis C. Anticuerpos contra el HCV que de otro modo podrían haber transmitido el virus.⁶

Se trata de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas que utiliza proteínas recombinantes derivadas de regiones centrales del virus HCV para detectar la presencia de anticuerpos contra el HCV en sueros humanos.

Principio:

Múltiples epítomos de proteínas del HCV (Core, NS3, NS4 y NS5) se unen a los pocillos de microtitulación. Cuando los anticuerpos contra el HCV están presentes en la muestra de prueba, reaccionan con las proteínas recombinantes y se adhieren a la fase sólida. Los anticuerpos no reactivos se eliminan con la solución de lavado. Las IgG humanas unidas al antígeno se hacen reaccionar con un conjugado de peroxidasa IgG antihumana y se visualizan mediante reacciones posteriores con un sustrato cromogénico. La muestra positiva genera un color azul medio a oscuro. Ningún color o un color azul muy pálido indica una reacción negativa. La intensidad de la reacción se cuantifica fotométricamente.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 × 12 tiras, 96 pocillos.
- Control Positivo, 1 vial, 1 mL.
- Control negativo, 1 vial, 1 mL.
- Diluyente de Muestra, 1 vial, 12 mL.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 12 mL
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 30 mL (concentrado 20X).
- Sustrato A, 1 vial, 6 mL.
- Sustrato B, 1 vial, 6 mL.
- Solución de parada, 1 vial, 6 mL.
- Bolsa plástica, 1 unidad.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 2 piezas.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministren varias medidas con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua desmineralizada.

Precauciones y Advertencias:

Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de este producto resultó negativo para la presencia de anticuerpos contra el VIH-1/VIH-2, así como para el antígeno de superficie de la hepatitis B, utilizando un método comercial autorizado. No obstante, debido a que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad completa de la ausencia de agentes infecciosos, este producto debe manipularse con precaución.

- Evite el contacto de los reactivos con los ojos y la piel. Si eso ocurre, lávese bien con agua.
- Use guantes.
- No pipetear con la boca.
- No fume.
- Deseche todos los materiales usados en un contenedor adecuado para desechos biopeligrosos. Los restos de muestras, controles, reactivos aspirados y puntas de pipeta deben recogerse en un recipiente para este fin y esterilizarse en autoclave durante 1 hora a 121°C o trate con hipoclorito de sodio al 10 % (concentración final) durante 30 minutos antes de su eliminación. (Los restos que contengan ácido deben neutralizarse previamente a la adición de hipoclorito de sodio).
- Ajuste el lavado de la placa utilizada (fondo plano) para lavar correctamente.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- No utilice reactivos después de la fecha de caducidad.
- Se debe tener mucho cuidado para evitar la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de los reactivos.
- Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra y cada reactivo.
- Los jabones y/o oxidantes que queden en los recipientes utilizados para la solución sustrato-TMB pueden interferir en la reacción.

Almacenamiento y Estabilidad:

Los kits de prueba sin abrir deben almacenarse entre 2 y 8°C al recibirlos y la microplaca debe guardarse en una bolsa sellada para minimizar la exposición al aire húmedo. Use los reactivos lo antes posible después de desempacar el kit.

Recolección y Preparación de Muestras:

El suero debe prepararse a partir de una muestra de sangre total obtenida mediante técnicas médicas aceptables. En esta prueba se puede utilizar suero o plasma. Retire el suero o el plasma del coágulo o de las células sanguíneas lo antes posible para evitar la hemólisis. Las muestras con gran cantidad de partículas deben clarificarse mediante centrifugación antes de su uso. Se pueden utilizar muestras congeladas a -20°C o menos. Evite congelar y descongelar repetidamente.

Procedimiento de Prueba:

Se recomienda encarecidamente analizar cada muestra y control por duplicado. Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso.

- Dispense 100 µl (o 3 gotas) de diluyente de muestras en pocillos de prueba individuales.
- Dispense 100 µl de control positivo y control negativo por duplicado en pocillos individuales.
- Agregue 10 µl de cada muestra de prueba en pocillos de prueba duplicados; vértice para mezclar.
- Incubar durante 30 minutos a 37°C.
- Lave cada pocillo 5 veces llenándolos con solución de lavado diluido, luego invierta vigorosamente la placa para sacar toda el agua y bloquee el borde de los pocillos con papel absorbente durante unos segundos.
- Agregue 100 µl de conjugado enzimático a cada pocillo. Mézclelo suavemente haciendo girar la placa en un banco plano durante 1 minuto. No agregue el conjugado enzimático al pocillo en blanco.

- Incubar durante 20 minutos a 37°C.
- Lave cada pocillo 5 veces llenándolos con solución de lavado diluido, luego invierta vigorosamente la placa para sacar toda el agua y bloquee el borde de los pocillos con papel absorbente durante unos segundos.
 - Agregue una gota (50 µl) de solución de sustrato A (HRP-sustrato) a cada pozo, luego agregue una gota (50 µl) de solución de sustrato B (TMB) a cada pozo. Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 10 minutos. .
 - Agregue una gota (50µl) de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción de color.
 - Lea la absorbancia a 450 nm. Si se utiliza un instrumento de doble filtro, establezca la longitud de onda de referencia en 630 nm (usando el valor de absorbancia del pocillo en blanco para corregir todas las lecturas de absorbancias de todos los pocillos o a 450 nm/630 nm con un lector de placa de doble filtro).

Cálculos:

Tome los valores promedio de absorbancia del control negativo y los tiempos 2.1:

$$2.1 \times NC \times x = \text{Corte.}$$

Si el valor de la absorbancia del control negativo es inferior a 0,07, debe informarse como 0,07. Si es superior a 0,07, debe informarse como el valor real de absorbancia medido.

Lectura de absorbancia positiva: \geq Valor de corte
Lectura de absorbancia negativa: $<$ valor de corte

Limitaciones:

- Al igual que los demás inmunoensayos sensibles, existe la posibilidad de que se produzca una reacción no repetible debido a un lavado inadecuado. Así que aspire el pozo o elimine todo el contenido de los pozos por completo antes de agregar la solución de lavado.
- Al igual que con todas las pruebas de diagnóstico, no se debe realizar un diagnóstico clínico definitivo basado únicamente en los resultados de una sola prueba. Se necesita una evaluación completa por parte del médico para un diagnóstico final.
- Las muestras con resultado positivo o equívoco deben volver a analizarse por duplicado. Si ambos valores de repetición de la prueba son inferiores al valor de corte, la interpretación final de la prueba es negativa para anticuerpos contra el HCV. Si el resultado es repetidamente positivo o equívoco, la muestra debe investigarse más a fondo con otros métodos.
- El rendimiento óptimo del ensayo requiere un cumplimiento estricto del procedimiento de ensayo descrito. La desviación del procedimiento puede conducir a resultados aberrantes.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por el HCV.

Referencias:

1. Kuo,G, Choo Q-L, Alter, HJ, et al. Un ensayo para anticuerpos circulantes contra un virus etiológico importante de la hepatitis humana no A, no B. *Ciencia* 1989. 244:362-4.
2. Esteban JI, González A, Hernández JM, et al. Evaluación de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en un estudio de hepatitis asociada a transfusiones. *N Engl J Med* 1990. 323:1107-12.
3. Miyamura T, Saito I, Katayama T, et al. Detección de anticuerpos contra el antígeno expresado por ADNc del virus de la hepatitis C clonado molecularmente: aplicación al diagnóstico y análisis de sangre para la hepatitis postransfusional. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990. 87:983-7.
4. Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, et al. Anticuerpos contra el virus de la hepatitis C entre los grupos de riesgo en España. *Lancet* 1989. 2:294-7.
5. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Q-L. Biología molecular de los virus de la hepatitis C: implicaciones para el diagnóstico, desarrollo y control de enfermedades virales. *Hepatology* 1991. 14:381-8.

6. El desafío de la vigilancia de la hepatitis C en Europa: <http://www.eurosurveillance.org/em/v08n05/0805-221.asp>
7. Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, Schable CA y Fields HA. Hepatitis post transfusión no A, no B: propiedades fisicoquímicas de dos agentes distintos. *enfermedad infecciosa J*; 148(2): 254-265, 1983.
8. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW y Houghton M. Aislamiento de un clon de ADNc derivado de un genoma de hepatitis viral no A, no B transmitido por la sangre. *Ciencias*; 244: 359-362, 1989.
9. Kuo G, Choo QL, Alter HJ et al. Un ensayo para anticuerpos circulantes contra un virus etiológico principal de la hepatitis humana no A, no B. *Ciencia*; 244: 362-364, 1989
10. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M y Bradley DW. Virus de la hepatitis C: el principal agente causal de la hepatitis viral no A, no B. *Br Med Bull*; 46: 423-441, 1990.
11. Esteban JI, Genesca J y Alter HJ. Hepatitis C: biología molecular, patogenia, epidemiología, características clínicas y prevención. *Enfermedad hepática progresiva*; 10: 253-282, 1992.
12. Allain JP, Kitchen A, Aloysius S, Reeves I, Petrik J, Barbara JAJ y Williamson LM. Seguridad y eficacia de la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en donantes de sangre con dos ensayos de detección secuenciales. *Transfusión*; 36 (5): 401-405, 1996.
13. Schmunis GA, Zicker F, Cruz JR y Cuchi P. Seguridad del suministro de sangre para enfermedades infecciosas en los países de América Latina, 1994-1997. *Diario Americano de Medicina Tropical e Higiene*; 65 (6): 924-930, 2001.
14. Dominguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P and Salleras LI. Encuesta seroepidemiológica comunitaria de infección por VHC en Cataluña, España. *Revista de Virología Médica*; 65 (4): 688-693, 2001.
15. Abdel-Hamid M, El-Daly M, El-Kafrawy S, Mikhail N, Strickland GT y Fix AD. Comparación de inmunoensayos enzimáticos de segunda y tercera generación para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C. *Revista de Microbiología Clínica*; 40 (5): 1656-1659, 2002
16. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*; 36 (5, Suppl 1): S21-29, 2002.
17. Guertler LG. Virus safety of human blood, plasma, and derived products. *Thrombosis Research*; 107 (S39-S45), 2002

