

**Immunoensayo de la Enzima para la Determinación Cualitativa de Anticuerpos contra el Virus de la Hepatitis C en suero o plasma humano.**

**Solo para diagnóstico In Vitro  
Para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete  
Conservar entre 2°C a 8°C**

## NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de HCV

## USO DESTINADO

ADVANCED HCV ELISA es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C en suero o plasma humano. Es una prueba de escrutinio para los donadores de banco de sangre y de soporte en el diagnóstico de condiciones clínicas relacionadas a la infección con el virus de la Hepatitis C (HCV).

## INTRODUCCIÓN

La Hepatitis C (HCV) se reconoce como causa primaria de las transfusiones asociadas a la hepatitis NANB. El HCV es un virus RNA de cadena sencilla y comparte similitudes con los Flavivirus y virus de la peste y se encuentran distribuidos a nivel mundial.

A pesar de que el cuadro agudo de la infección del HCV es generalmente moderado, es muy frecuente que se encuentre asintomático y solamente del 10 al 25 % de los pacientes desarrolla ictericia y más del 50 % de los individuos infectados desarrolla hepatitis crónica con serios daños y secuelas de tratamiento tales como cirrosis y carcinoma hepato-celular. Se estima que la prevalencia de HCV en donadores de sangre a nivel mundial está en el rango del 0.5 al 8. Se ha reportado que la incidencia tiende a disminuir debido al mejoramiento de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico y a la selección del donador.

El diagnóstico del HCV es dependiente de la detección directa del RNA viral por PCR o por la detección de anticuerpos anti-HCV. Las técnicas de DNA recombinante para el escrutinio de anticuerpos se utilizan para determinar las proteínas estructurales y no estructurales derivadas del RNA del HCV. Las pruebas de anti-HCV de primera generación con solamente proteínas NS4 que han evolucionado hasta las de tercera generación que incluyen la parte "Core" (estructural), las proteínas NS3 (No estructurales), NS4 (No estructurales) y NS5 (No estructurales). Estudios realizados demuestran que las pruebas de tercera generación mejoraron la sensibilidad y la detección temprana de la etapa de seroconversión en relación a la reactividad cruzada con el antígeno NS3. La prueba mejorada para anti-HCV utiliza antígenos de las regiones NS3, NS4 y NS5 del virus. Los antígenos han sido cuidadosamente obtenidos y seleccionados para proveer una prueba diagnóstica sensible y específica.

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El producto ADVANCED HCV ELISA, el suero humano o plasma se diluye con un diluyente de muestra y se incuba en los pocillos recubiertos de antígenos recombinantes del HCV (CORE/NS3/NS4/NS5). Si el anticuerpo está presente en la muestra, las inmunoglobulinas de la muestra

del paciente se fijan a los pocillos recubiertos. Después de remover el complejo antígeno-anticuerpo con una solución que contiene peroxidasa de rábano picante pegada a anticuerpos de cabra dirigidas contra inmunoglobulinas de cadena pesada y cadenas ligeras. Posteriormente se lavan los pocillos y el conjugado sin reaccionar se remueve. Se agrega el sustrato, tetrametilbencidina (TMB). Durante la incubación el sustrato se hidrolizará por la acción de la enzima y desarrollará un color azul-verdoso en los pocillos que contengan anticuerpos específicos del HCV.

La acción de la enzima se detiene al agregar el ácido sulfúrico. La intensidad del color desarrollado se lee espectrofotométricamente a 450nm y es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.

## REACTIVOS

### Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Microplaca con pocillos recubiertos de Antígeno
2. Conjugado concentrado (20x)
3. Control Positivo Anti-HCV
4. Control Negativo Anti-HCV
5. Diluyente de Muestra
6. Diluyente de Conjugado
7. Solución A (Solución  $H_2O_2$ )
8. Solución B (Sustrato TMB)
9. Solución de paro (Ácido Sulfúrico 2M)
10. Buffer de lavado concentrado (20x)
11. Sellador de la placa
12. Bolsa de plástico

### Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas para dispensar volúmenes de 1 – 1000  $\mu$ L
2. Puntas para pipetas
3. Incubador a 37°C
4. Agua destilada o desionizada
5. Lavador de placas Microelisas
6. Lector de tiras de ELISA

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

1. Este producto es solamente para uso de diagnóstico *In vitro*.
2. Médicos o personal técnico solamente deberán de utilizar este producto.
3. Agitar suavemente cada reactivo antes de utilizarlo.
4. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad.
5. No mezcle reactivos de lotes diferentes.
6. Evitar contaminación microbiana de los reactivos.
7. Evitar la exposición de la solución TMB a la luz intensa, metales u oxidantes. Ya que puede disminuir la coloración y deberá descartarse.

## INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

1. **Material biológico potencialmente infeccioso: Este producto contiene componentes de sangre humana y se debe manejar como agente infeccioso.** Las pruebas conocidas no ofrecen una completa seguridad que los productos derivados de la fuente humana no transmiten la infección, por lo que, todos los derivados de



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

### Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.  
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria  
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México  
**Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas**  
**Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas**

la sangre se deben considerar como potencialmente infecciosos, asimismo es recomendado que éstos reactivos y muestras humanas se manejen de acuerdo a buenas prácticas de trabajo del laboratorio. Por seguridad del control positivo se ha inactivado por calentamiento.

- No fumar o comer en áreas donde se estén manejando las muestras o productos.
- No pipetear con la boca. Usar guantes de plástico desechables cuando se manipulen reactivos o muestras y lavarse las manos con hipoclorito de sodio al 5%.
- Las muestras infecciosas y derramamientos no ácidos deben limpiarse con hipoclorito de sodio al 5%.
- Todos los materiales desechados deben desinfectarse adecuadamente antes de tirarlos. Tanto los materiales líquidos como sólidos deben someterse a la autoclave a 121°C al menos por una hora. Los desechos sólidos también pueden incinerarse, los desechos líquidos no ácidos también pueden diluirse a una concentración final de 1.0%. Los desperdicios líquidos requieren neutralizarse por 30 minutos para obtener una desinfección completa antes de desecharse.
- Evitar el contacto del ácido sulfúrico con la piel y mucosas de membrana. Si llegara ocurrir se deberá lavar inmediatamente con agua.

### RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

- Obtener muestras de suero o plasma por los procedimientos regulares del laboratorio clínico. Separar el suero del coagulo o el plasma de la sangre tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
- Las muestras que contengan azida de sodio o materiales particulados pueden ocasionar resultados erróneos.
- Las muestras se deben refrigerar si no se utilizan dentro de los 3 días posteriores a la recolección. Las muestras congeladas se deben descongelar y mezclar antes de hacer el ensayo. Evitar congelar y descongelar las muestras por más de 2-3 veces antes de usarlas.

### CONSERVACIÓN DEL REACTIVO

- Los reactivos del producto deben conservarse de 2-8°C. Utilizar los reactivos lo más pronto posibles.
- Si la placa no se utiliza completamente, cubrir los pocillos sin usar con el sellador de placa, meterlos en la bolsa de plástico con el desecante y dejarlos de 2-8°C.
- Revisar la solución de buffer concentrada por la presencia de cristales de sales. Si los cristales se han precipitado antes de usarla, calentar la solución a baño maría de 37 - 40°C hasta disolver los cristales.

### PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- La solución de trabajo del Conjugado
  - El Conjugado y el diluyente del Conjugado deben estar a temperatura ambiente antes de usarse.
  - Los recipientes para mezclar deben estar limpios.
  - Diluir el conjugado al volumen requerido a una proporción de 1:20 con el diluyente del conjugado referido en la siguiente tabla. Mezclar suavemente sin dejar espuma.
- Refrigerar las porciones no usadas de 2-8 °C y usarlas no por más de una semana.

#### Tabla de dilución del Conjugado:

Numero de pruebas	16	24	32	40	48	56	64	72-80	88-96
Diluyente del conjugado (mL)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Conjugado concentrado (µL)	100	150	200	250	300	250	400	450	500

### 2. Buffer de lavado

- Diluir 1 volumen del buffer de lavado concentrado con 19 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
- El buffer de lavado se puede conservar a temperatura ambiente por una semana.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

(El proceso del ensayo se puede realizar de manera manual o automática con un analizador de microplaca)

- Dejar que todos los reactivos y muestras estén a temperatura ambiente (18-25°C) para el ensayo. Mezclar suavemente antes de usarlos.
- Preparar los números requeridos de pocillos, incluyendo uno para el Blanco de reactivos, tres para el control negativo, dos para el control positivo y un pocillo para cada muestra. Anotar en una hoja de reportes el número de Controles y Muestras.
- Agregar 100 µL del diluyente de muestra a cada pocillo.
- Agregar 10µL de muestra, Control Negativo y Control Positivo a cada pocillo seleccionado de acuerdo a la hoja de reportes. (Reservar 1 pocillo para el Blanco)
- Tape la placa para mezclar. *Nota: No derramar líquidos en las orillas de la placa.*
- Incubar la placa en baño Maria a 37°C o en incubador por 25 minutos.
- Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado y de acuerdo con el procedimiento del lavado. **A) El lavado deberá desarrollarse estrictamente de acuerdo con las instrucciones, lavados incompletos afectaran la prueba. B) Aspirar el contenido de los pocillos completamente en un frasco de desecho. Después llene los pocillos completamente en un frasco de evitar que se derrame. Aspirar completamente, repetir los lavados y dejar remojar cuatro veces adicionales por un total de cinco lavados. C) Estar seguros que no queden líquidos remanentes en las tiras y en el contenedor de las tiras después de la última aspiración (ej., con papel absorbente). En caso de ser necesario invertir la placa y dar un golpe firme sobre la toalla de papel absorbente para eliminar el exceso de buffer de lavado. Nota: Lavados inadecuados causarán falsos resultados.**
- Agregar 100 µL de la solución de trabajo de conjugado a cada pocillo. *Nota: No toque los bordes de los pocillos para evitar falsos resultados.*
- Incubar la placa a 37°C en baño Maria o en incubador por 25 minutos.
- Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado de acuerdo al procedimiento de lavado.
- Agregar 50 µL de Solución A y 50 µL de Solución B a cada pocillo en éste orden, cubrir la placa y mezclar.
- Incubar la placa a 37°C en baño Maria o en incubador por 10 minutos.
- Parar la reacción agregando 50 µL de la solución de paro a cada pocillo (mantener la misma secuencia de pipeteo y los intervalos de tiempo utilizados para la solución A/B), tapar la placa para mezclar.
- Leer la absorbancia de la solución en cada pocillo a 450 nm (con un filtro) o a 450 y 630nm como referencia (dos filtros).

### CALCULO DE RESULTADOS

La presencia o ausencia de anticuerpos para HCV está determinado por los valores de la absorbancia de la muestra relacionados al valor de corte (cut-off).

#### 1. Una corrida es válida si:

- El Blanco, Controles Positivo y Negativo se incluyeron en cada ensayo.
- El valor del Blanco debe tener una absorbancia <0.100
- El Control Negativo debe tener una absorbancia <0.100 después de

restar el Blanco.

D) El Control Positivo Anti- HCV debe tener una absorbancia >0.800 después de restar el Blanco.

### 2. Cálculos del control

Promedio de los Controles Negativos (CNx)

$$CNx = (CN1 + CN2 + CN3) / 3$$

Eliminar cualquier CN más grande que (>) 0.100

Determinar el promedio de los Controles Negativos como se muestra en el siguiente ejemplo:

No. Muestra del Control Negativo	Absorbancia
1	0.019
2	0.022
3	0.019
Promedio de los Controles Negativos (CNx)	0.020

### 3. Cálculo del Valor del Corte

Valor de corte =  $0.120 + CNx$

Cálculo del valor de corte como se muestra en el ejemplo anterior:

$$CNx = 0.020$$

$$\text{Valor de corte} = 0.120 + 0.020 = 0.140$$

### 4. Cálculo de la muestra

Calcular la absorbancia para cada muestra restando el valor del Blanco.

Si la corrección del Blanco se realiza en el lector de la microplaca, omite éste paso. Determinar el valor de las muestras de acuerdo al siguiente ejemplo:

No. Muestra	Absorbancia	DO/VCO	
1	0.029	$0.029 / 0.140 = 0.207$	< 1.00
2	0.482	$0.482 / 0.140 = 3.443$	> 1.00

En los ejemplos anteriores, la muestra No.1 (0.029) es negativa y la muestra No. 2 (0.0482) es positiva para anticuerpos del HCV cuando se compararon con el valor de corte de 0.140.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Las muestras con valores de absorbancia menores que el valor del corte (por ej. DO/VCO menor 1.00) se consideran negativas.
- Las muestras con absorbancia iniciales si son más grandes o iguales al valor de corte (por ej. DO/VCO  $\geq$  1.00) se consideran positivas.
- Las muestras que se encuentran positivas repetidamente se puede interpretar como positivas para anticuerpos del HCV de acuerdo al criterio de éste inmunoensayo.
- Las muestras no reactivas inicialmente y en las pruebas de repetición se consideran negativas para anticuerpos HCV.
- Las muestras que son repetidamente positivas en éste ensayo se deben repetir por otras pruebas más específicas.

Los resultados falsos pueden deberse por uno de los siguientes problemas técnicos:

- Arrastre de muestras muy reactivas debido a la contaminación con equipo o por puntas de pipetas.
- Contaminación de sustrato con iones de metal.
- Contaminación cruzada.
- Lavados inadecuados o por aspiraciones durante el proceso de lavado.
- Falla para quitar el exceso de humedad de la parte del fondo del pocillo.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las muestras con resultados positivos o erróneos deben de reanalizarse por duplicados. Si el resultado es repetidamente positivo o erróneo, la muestra debe ser ensayada con otros métodos. Muestras positivas repetidamente deben ensayarse con un método confirmatorio adicional tales como Western Blot, inmunofluorescencia o RIBA.

Los ensayos óptimos requieren una aplicación estricta al procedimiento descrito. Desviaciones del procedimiento pueden ocasionar resultados aberrantes.

Como en todo los inmunoensayos altamente sensibles, hay la posibilidad que no ocurran resultados positivos repetibles.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición con HCV.

## RESULTADOS ESPERADOS

Entre 10745 donadores de sangre escogidos al azar de cuatro sitios, 37 (0.34%) muestras fueron reactivas repetidamente para anti-HCV por el ADVANCED HCV ELISA

En poblaciones conocidas y seleccionadas por tener un riesgo alto para la infección del HCV, 87 % de las muestras fueron de hemofílicos, 77.5 % de drogadictos, 69.35% de pacientes diagnosticados para Hepatitis aguda No-A, No-B (NANB) verificados por biopsia y 81.03 % de las muestras de pacientes con NANB crónica comprobada por biopsia. Todos fueron repetidamente reactivos para anticuerpos HCV por el ADVANCED HCV ELISA.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### PRECISIÓN

La reproducibilidad del ensayo fue determinada analizando cuatro muestras, y los negativos positivos del producto en réplicas de 5 en cuatro corridas consecutivas en un periodo de dos días utilizando el mismo lote del material.

Se calculó la desviación estándar (DE) de intra e inter-ensayos y el porcentaje del coeficiente de variación (% CV). Ver TABLA I.

El promedio S/CO se define como el promedio del valor de absorbancia de la muestra (A450/630) dividida entre el Valor del Corte (Cut-off).

**TABLA I**

Reproducibilidad de ADVANCED HCV ELISA

MUESTRA	PROMEDIO S/CO	INTRA-ENSAYO		INTER-ENSAYO	
		D.E.	% CV	D.E.	% CV
1	4.023	0.267	6.6	0.113	2.8
2	2.996	0.209	7.0	0.092	3.1
3	1.486	0.121	8.1	0.049	3.3
4	0.612	0.029	4.7	0.023	3.8

CONTROL	PROMEDIO A450/630	INTRA-ENSAYO		INTER-ENSAYO	
		D.E.	%CV	D.E.	%CV
NEGATIVO	0.027	0.004	14.8	0.003	11.1
POSITIVO	1.458	0.092	6.3	$\leq$ 0.001	$\leq$ 0.1

## SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

A la fecha no hay un estándar reconocido para establecer la presencia o ausencia de Anticuerpos para HCV en sangre humana, por lo tanto, la sensibilidad y especificidad se ha estimado como se describe a continuación:

- La sensibilidad del ADVANCED HCV ELISA puede definirse como la habilidad para detectar como reactivas aquellas muestras de pacientes con enfermedades conocidas por estar asociadas con la infección del HCV. La sensibilidad para éste ensayo fue determinado

utilizando dos diferentes poblaciones con diagnóstico clínico y comprobación por biopsia para hepatitis aguda o NANBH crónica. Los siguientes datos fueron obtenidos de estudios realizados en InTec products, Inc.

(i) De las 62 muestras de pacientes con NANBH aguda, 43 (69.35%) fueron reactivos en ensayos repetitivos por el ADVANCED HCV ELISA (tabla III). La sensibilidad del ensayo basado en ésta población es de 57.88 80.82 % (95 % CI).

(ii) De las 58 muestras de pacientes de NANBH aguda, 47 (81.03%) fueron reactivas en ensayos repetidos por el ADVANCED HCV ELISA (TABLA III). La sensibilidad del ensayo basado en ésta población fue de 70.94 91.12 % (95 %CI).

2. La especificidad del ADVANCED HCV ELISA puede definirse como la habilidad para detectar muestras no reactivas de poblaciones de bajo riesgo. Utilizando donadores de sangre voluntarios de estudios clínicos (Tabla 11, suero) de población de bajo riesgo, y asumiendo que el 100% de ésta población deben ser negativos, la especificidad del ensayo se estimó en 99.49 99.73 % (95% CI)

**TABLA II**  
Reactividad de anti-HCV en muestras de suero de donadores de sangre.

SITIO	No. ENSAYADO	No. REACTIVO (%)	INICIALMENTE REACTIVO (%)	REPETIDAMENTE REACTIVO (%)
1	3025	3011 (99.54%)	14 (0.46%)	13 (0.43%)
2	2637	2629 (99.70 %)	8 (0.30%)	8 (0.30%)
3	2482	2473 (99.64%)	9 (0.36%)	7 (0.28%)
4	2601	2590 (99.58%)	11 (0.42%)	9 (0.35%)
<b>TOTAL</b>	<b>10745</b>	<b>10703 (99.61%)</b>	<b>42 (0.39%)</b>	<b>37 (0.34%)</b>

De las 14 muestras reactivas iniciales del Sitio 1, una (7.14%) no fue reactiva en la repetición, de las 8 muestras reactivas iniciales del Sitio 2, ninguna fue reactiva en el análisis, de las 9 muestras reactivas iniciales del Sitio 3, dos (22.22%) no fueron reactivas en la repetición, de 11 muestras reactivas iniciales del Sitio 4, dos (18.18 %) no fueron reactivas en el análisis.

**TABLA III**  
Reactividad de HCV en muestras de suero de pacientes con HCV asociadas a la enfermedad o alto riesgo para infecciones de HCV y de pacientes con otras enfermedades.

GRUPO	Numero de muestras ensayadas	Repetidas	Reactivas
NANBH aguda	62	43	69.35%
NANBH crónica	58	47	81.03%
Hemofílicos	100	87	87.00 %
Usuarios de drogas IV	120	93	77.50%
Enferm. De hígado	40	7	17.58%
Otras enfermedades	10	3	30.0 %

## REFERENCIAS

1. Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of IgG. *Immunochemistry* 1971; 8:871-74.
2. Choo Q-L, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46:423-41.
3. Kuo G, Chao Q-L, Alter HJ et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244:362-4
4. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Chao Q-L, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321 :1494-500.
5. Esteban JI, Gonzalez A, Hernandez JM et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med* 1990; 323: 1107-12.
6. Van der Poel CL, Reesink HW, Lelie PN, Leentvaar-Kuypers A, Chao Q-L, Kuo G, Houghton M. Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. *Lancet* 1989; 2:297-98.
7. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-61.
8. Alter HJ, Holland PV, Morrow AG et al. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975; 2:838-41.
9. Alter HJ. The dominant role of non-A, non-B in the pathogenesis of post-transfusion hepatitis; a clinical assessment. *Clin Gastroenterol* 1980; 9:155-70.
10. McHutchison JG, Person JL et al. Improved detection of hepatitis C Virus antibodies in high risk populations. *Hepatology* 1992; 15: 19-25.
11. 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.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Proposed guideline: Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood and tissue. Villanova, PA:
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987; 7(9). (NCCLS document M29-P)
14. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981; 42:762-7.
15. 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.
16. Interstate Shipment Etiologic Agents, 42 CFR Part 72.
17. 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 (19). (NCCLS document I/LA 18-P)
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved guideline. Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions. Villanova, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990. (NCCLS document C24-A)

