
INTRODUCCIÓN

La Hepatitis No A, No B (HNANB) representa más del 90 % de las hepatitis adquiridas por vía parenteral a través de la sangre o sus derivados, y se ha sugerido que hasta el 10 % de los donantes pueden ser infecciosos (1,2). Como mínimo, más de la mitad de las HNANB evolucionan a la cronicidad y en una alta proporción se alcanza la cirrosis y el hepatocarcinoma (3,4).

Con la identificación del virus de la Hepatitis C (VHC) en 1989 (5) y el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos para su estudio, se ha comprobado que el VHC es la principal causa de la HNANB post-transfusional y que la presencia de anticuerpos contra el mismo en el suero o plasma de una persona indica que la misma ha estado expuesta al virus, y por tanto, constituye un transmisor potencial de la enfermedad (6,7,8,9). Es por ello que la determinación de anticuerpos al VHC en suero, plasma o sangre seca sobre papel de filtro, es de esencial importancia en:

- 1.-El pesquisaje de donantes de sangre.
- 2.-El control de grupos de riesgo.
- 3.-El estudio de pacientes con hepatopatías.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA HCV es un ensayo inmunoenzimático indirecto que utiliza como fase sólida placas de tiras de ultramicroELISA recubiertas con péptidos sintéticos, correspondientes a las regiones del núcleo, regiones no estructurales NS4 y NS5 y una proteína recombinante de la región NS3 del VHC. Las muestras se incuban en los pocillos de las placas y si éstas contienen anticuerpos específicos se fijarán a los antígenos del recubrimiento. A continuación, previo lavado que elimina los componentes no fijados, se añade un conjugado Anti IgG Humana/Fosfatasa Alcalina (F.A.). En caso de reacción positiva este anticuerpo marcado se unirá al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Un nuevo lavado de la tira eliminará entonces el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato), éste será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos al VHC en la muestra.

**CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.
Código UM 2024 (288 pruebas) y Código UM 2124 (480 pruebas)**

Contenido:	UM 2024	UM 2124
Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3	5
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL	2 x 25 mL
R2: Suero de Carnero	1 x 18 mL	1 x 18 mL
R3: Control Negativo	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
R4: Control Positivo	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 mL	1 x 18 mL

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.

Los controles resultaron negativos a las pruebas de detección de Anti-VIH 1+2, HBsAg. El Control Positivo ha sido inactivado por tratamiento térmico.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R2: Diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 mL (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R3: Listo para usar.

R4: Listo para usar.

R5: Listo para usar. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.

R6: Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 °C. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante 2 meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante 2 meses de 2 a 8 °C en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Papel absorbente.
- Hipoclorito de Sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 5 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL
- Incubadora a 37 ± 1 °C.

PRECAUCIONES

- Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Las muestras de sangre seca deben ser colectadas sobre papel de filtro **S&S 903**.
- Manipule las muestras y controles como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro **S&S 903**, almacenadas de 2 a 8 °C, son estables durante 3 meses y almacenadas a temperatura ambiente (hasta 32 °C) son estables durante 15 días. (10)
- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con las muestras como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.

-
-
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.
 - Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y las muestras.
 - No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.
 - Los sueros a utilizar deben ser preferentemente frescos, no inactivados por calor y sin precipitados. Evite la congelación y descongelación reiterada de las muestras.
 - Verifique que todas las tiras de reacción estén bien niveladas en el soporte.
 - Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.
 - Tome todas las precauciones para **evitar la neutralización del conjugado** que puede producirse con material contaminado con suero humano.
 - Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
 - Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
 - Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
 - El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
 - Los reactivos del UMELISA HCV de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1. - Preparación de las muestras y controles. Los controles se presentan en el estuche listo para usar.

Procedimiento A: Para muestras de suero o plasma. Diluya las muestras 1:21 con la solución de trabajo R2 (5 µL de suero + 100 µL de la solución).

Procedimiento B: Para muestras de sangre colectadas en papel de filtro **S&S 903**. Corte con un perforador para papel un disco de 5 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Dépositelo en un recipiente apropiado y añádale 70 µL de solución R2 de trabajo. Incube, como mínimo, una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Homogeneice suavemente una vez añadida la solución R2.

2. - Adición de las muestras y controles a la tira de reacción.

Coloque 10 µL de las muestras previamente diluidas y de los controles sobre los pocillos de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	B	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	P	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

El Control Positivo (P) y el Control Negativo (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión. Como Blanco (B) utilice la solución R2 de trabajo.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA HCV para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3. - Incubación de las muestras y controles.

Procedimiento A: Incube las tiras durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

Procedimiento B: Incube las tiras durante una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C) en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4. - Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción 4 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo. La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5. - Adición del conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

6. - Incubación del conjugado.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7. - Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8. - Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de la tira de reacción.

9. - Incubación del sustrato.

Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 25 °C). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 60 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

10. - Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMELISA HCV, o pueden hacerse manualmente por el operador siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

CONTROL DE LA CALIDAD

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

a) Al menos uno de los duplicados del Blanco (B1 o B2) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.

b) Al menos uno de los duplicados del Control Negativo (N1 o N2) debe presentar una fluorescencia que no supere en más de 10 unidades a la media del Blanco.

c) Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (P1 o P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60 y 180 unidades.

d) $(NN - BB) / (P - BB) < 0,1$ Donde:

NN: Valor promedio del Control Negativo.

BB: Valor promedio del Blanco.

P: Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo que se encuentre dentro de los límites de calidad.

NIVEL DE CORTE

Las muestras de suero, plasma o sangre seca sobre papel de filtro se consideran positivas cuando:

$$(F_i - BB)/(P - BB) \geq 0,300 \quad F_i = \text{Fluorescencia de la muestra.}$$

Una muestra es clasificada como “**BL**” cuando:

$$0,300 > (F_i - BB)/(P - BB) \geq 0,255$$

O sea, las muestras se consideran dentro de la zona gris (“**BL**”) cuando su el resultado se encuentra entre el nivel de corte y un 15 % por debajo de este valor.

Para definir de una forma rápida el nivel de corte cuando no se dispone del programa automático, se calcula de la siguiente forma:

$$F_{nc} = 0,300 (P - BB) + BB$$

$$F_{bl} = 0,255 (P - BB) + BB$$

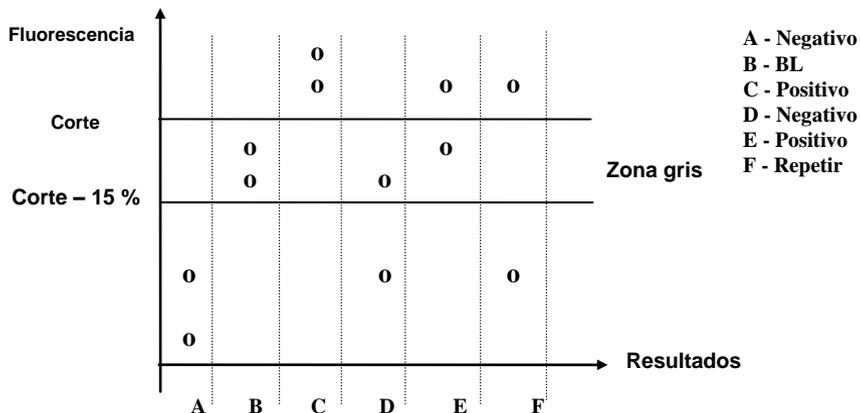
Donde: **Fnc**: valor de fluorescencia del nivel de corte.

Fbl: valor de fluorescencia del límite inferior de la zona gris.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I- Muestras analizadas por duplicado

La interpretación de los resultados se realizará según el siguiente diagrama:



II- Muestras analizadas de forma simple:

- Si se obtienen valores menores que el nivel de corte la muestra se considera no reactiva.
- Si se obtienen valores comprendidos dentro de la Zona gris ("BL") la muestra debe ser considerada en el umbral de positividad.
- Si una muestra presenta valores mayores o iguales que el nivel de corte, se considera reactiva ("POSITIVO").

Se recomienda que toda muestra con resultado ("POSITIVO") o ("BL") se repita antes de realizar una interpretación, utilizando la fuente original. Cuando la muestra ofrece resultados repetidamente reactivos ("POSITIVO") o ("BL") deberá ser referida para evaluación médica que deberá incluir pruebas adicionales (RIBA, LIA, PCR).

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

Se calculó utilizando paneles clasificados por otras técnicas inmunoenzimáticas de Tercera Generación. Se evaluó el Low Titer Performace Panel (PHV 103) de Boston Biomedica Inc., obteniéndose un 100 % de concordancia con los resultados ofrecidos por el método confirmatorio ORTHO HCV 3.0 (RIBA).

Otros grupos poblacionales estudiados:

Tipo de Muestra evaluada	VP	FN	VN	FP	S%	E%
Muestras de suero en donantes de sangre	104	0	8591	6	100	99,93
Muestras de suero de Plasmaféresis	1	0	519	0	100	100
Muestras de suero de Hemodializados	105	1	150	1	99,05	99,33
Muestras de sangre seca sobre papel de filtro	5	0	294	0	100	100

VP: Verdaderos Positivos **VN:** Verdaderos Negativos **FP:** Falsos Positivos
FN: Falsos Negativos **E%:** Especificidad **S%:** Sensibilidad

BIBLIOGRAFÍA

1. Choo, Q.L., Weiner, A.J., Overby, L.R. et al.: Hepatitis C Virus: The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *British Medical Bulletin* 46:423-441, 1990.
2. Wick, M.R., Moore, S., Taswell, .F.: Non-A, non-B hepatitis associated with blood transfusion. *Transfusion* 25:93-101, 1985.
3. Alter, H.J.: You'll wonder where the yellow went: A 15 years retrospective of posttransfusion hepatitis. En: Moore SB, ed. *Transfusion Transmitted Viral Diseases*. Arlington, VA. Am.Assoc.Blood Banks, pp 53-86, 1987.
4. Bradley, D.W.: The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *J.Virol.Methods* 10:307-319, 1985.
5. Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., et al.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362,1989.
6. Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., et al.: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244:362-364, 1989.
7. Roggendorf, M., Deinhardt, F., Rasshofer, R., et al.: Antibodies to hepatitis C virus. *Lancet* 324-325, 1989.
8. Van der Poel, C.M., Reesink, H.W., Schaasberg, W., et al.: Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies . *Lancet* 335:558-560,1990.
9. Donahue, J.G., Nelson, K.E., Munoz, A., et al.: Antibody to Hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am.J. Epidemiol.* 134: 1206-1211, 1991.
10. Elves, L.H., Loeber, J.G., The need for standardized bloodspot TSH-calibrators in congenital hypothyroidism screening. *Early Human Development* 45: 179-190, 1996.

Noviembre 10, 2004

UMELISA HCV

Códigos UM 2024 y UM 2124

**Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana,
Cuba. Teléfono.: 208-2929, Fax: (537) 208-6514.**