

PARA SER USADO SOLO EN INVESTIGACIÓN

RELEVANCIA CLÍNICA

El virus de la Hepatitis C (VHC), es uno de los agentes causales de las hepatitis virales, que puede cursar como una infección aguda o crónica. La evolución hacia la cronicidad se evidencia en más del 60% de los casos, pudiendo generar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. A nivel mundial se ha reportado que más de 100 millones de personas tiene evidencia serológica de infección por el VHC. Durante el año 2013 el VHC causo más de 704.000 muertes a nivel mundial, afectando significativamente a la población adulta. Sus principales rutas de transmisión son a través del uso de hemoderivados, diálisis y el uso de drogas endovenosas. Los anticuerpos específicos contra los antígenos del VHC comienzan a aparecer a partir de las 8 semanas post-infección (ver figura 1).

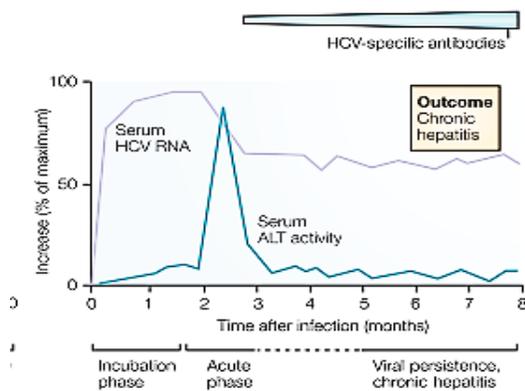


Figura 1. Curso de la infección por el VHC

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Las proteínas recombinantes: rNS1, rE2, rNS2, rNS3, rNS5 y rCore del VHC, obtenidas en un sistema de expresión procariótico, poseen gran capacidad para discriminar serológicamente a los individuos sanos y a los individuos infectados con el VHC. **La evaluación de la validez y seguridad diagnóstica muestra sensibilidad y valor predictivo negativo de 100%, así como especificidad y valor predictivo positivo por encima del 95%.** En este ensayo el suero problema se incubaba con los antígenos inmovilizado en placas de microtitulación, el inmunocomplejo se evidencia de forma directa por la reacción colorimétrica mediada por un sistema de detección acoplado a la enzima peroxidasa. **El ensayo permite la detección de anticuerpos tipo IgG.**

COMPOSICIÓN DEL KIT

- 1 placa de microtitulación de 96 pozos con proteínas rNS1, rE2, rNS2, rNS3, rNS5A, rNS5B, rCore
- 4 viales de 500 μ L de suero control negativo.
- 4 viales de 500 μ L de suero control positivo.
- 2 viales de 12 mL de solución diluyente de muestra (tapa verde).
- 2 viales de 6 mL de buffer de conjugado (tapa azul).
- 6 viales de conjugado (tapa blanca). **Guardar a -20°C.**
- 1 vial de 50 mL del reactivo W (**CONCENTRADO, 10X**).
- 1 vial de 5,5mL del reactivo A (**CONCENTRADO, 2X**).
- 1 vial de 5,5 mL del reactivo B (**CONCENTRADO, 2X**).
- 2 viales de 5,5 mL de solución S.

ALMACENAMIENTO

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

MUESTRAS

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

IMPORTANTE

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

PROCEDIMIENTO

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

CALCULO DE LOS RESULTADOS

1. En cada ensayo deben incluirse: un blanco, los sueros controles positivos y negativos, por duplicado, de no hacerse, la interpretación de la prueba puede producir resultados falsos.
 2. El valor del **blanco o pozo de referencia** deber ser restado a los valores obtenido de las densidades ópticas de los controles y sueros problemas.
 3. Determinar los valores promedio de los controles positivos y negativos.
 4. Para que el ensayo sea válido, el valor promedio de los controles positivos (**MCP**) debe ser mayor o igual a 2,4 veces al valor promedio de los controles negativos (**MCN**). Es decir: **MCP / MCN = mayor de 2,4**.
 5. Una vez determinada la validez del ensayo, calcular el valor del **punto de corte o cutoff**. Usar la fórmula: **Cutoff = 2,8 x MCN**.
 6. Los valores de DO por encima del cutoff se consideran positivos. Los valores de DO por debajo del cutoff se consideran negativos. Los valores de DO muy cercanos al cutoff se consideran **indeterminados**, se recomienda repetir la prueba y/o hacer seguimiento al paciente. *Para ser considerado indeterminado el resultado de la división del suero problemas entre el MCN debe ser **mayor de 2,7 y menor de 2,8***
 7. **EJEMPLO:**
Resultados controles negativos: 0,192 y 0,200
Resultados controles positivos: 0,750 y 0,800
 $MCN = (0,192 + 0,200) / 2 = 0,201$
 $MCP = (0,750 + 0,800) / 2 = 0,775$
 $MCP / MCN = 0,775 / 0,201 = 3,85$
 $Cutoff = 2,8 \times 0,201 = 0,562$
Indeterminado: Suero problema / MCN = 0,555 / 0,201 = 2,76. En estos casos debe recomendarse, repetir el ensayo en 3-4 semanas
1. Teran-Angel G, Colmenares M, Silva Gutiérrez N, Silva F, Paredes A, Calderón A, Peterson DL, Salmen S. Diseño de una prueba diagnóstica casera para la detección de anticuerpos tipo IgG contra el virus de la hepatitis C: Incorporación de la proteína de envoltura E2 y NS2 (sometido)
 2. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Methods Enzymol. 1980;70(A):419-39.
 3. Donis JH. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. Avances Biomed 2012; 1 (2), 73-81.