

HCV ELISA KIT

Conservar a 2-8°C

1.0 Resumen y explicación de la prueba

La hepatitis C (HCV), fue formalmente descrita como la transmisión parenteral de la no-A, no-B hepatitis (NANBH) 1, se convierte en una enfermedad crónica en el 50% de los casos.

El HCV también puede transmitirse a través del abuso de drogas por vía parenteral, sexual y contacto en el hogar.

La hepatitis C es un virus ARN de cadena única con algunas relaciones estructurales de la familia de los flavivirus. Secuencias de ácido nucleico de HCV cDNA ofrece la base para la construcción de péptidos recombinantes que representan a las proteínas del virus de la hepatitis C.

La detección de anticuerpos del Anti-virus de la hepatitis C en la sangre utilizando proteínas recombinantes o sintéticas, ayudó a identificar a los donantes de sangre aparentemente sanos con anticuerpos anti-HCV, que de otro modo podrían haber transmitido el virus. Esta es una enzima vinculada a ensayo inmunoenzimático usando proteínas recombinadas derivadas de regiones centrales del virus del HCV para detectar la presencia de anticuerpos del HCV en suero humano.

2.0 PRINCIPIO DE LA MUESTRA

Múltiples epítomos de las proteínas del HCV están unidos a los pocillos de microtitulación.

Cuando los anticuerpos contra el HCV están presentes en la muestra, reaccionan con las proteínas recombinantes y se unen a la fase sólida.

Los anticuerpos no-reactivos se eliminan con el buffer de lavado. IgGs humano unido al antígeno reaccionan con cabra-anti-humana IgG conjugado con peroxidasa y se visualizan por las reacciones posteriores con un sustrato cromogénico. Las muestras positivas generan un medio a oscuro color azul. Sin color o un color azul muy pálido indican una reacción negativa. La intensidad de la reacción se cuantificó fotométricamente.

3.0 REACTIVOS

Materiales suministrados en el kit:

3.1 Microplacas recubiertas:

Una microplaca con 96 pocillos recubiertos con el HCV proteínas recombinantes.

Almacenar a 2-8C.

3.2 conjugado enzimático:

Un vial (11,5 ml) que contiene una solución de conjugado de cabra anti-humano-IgG-HRP. Conservar a 2-8 C.

3.3 Control Negativo:

Un vial (1,0 ml) de suero normal inactivado por calor humano normal no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y anticuerpos anti-HCV. Conservar a 2-8 c.

3.4 Control Positivo:

Un vial (1,0 ml) de suero inactivado por calor humano conteniendo anticuerpos anti-HCV con azide de sodio 0,02%. Conservar a 2-8 C.

3.5 Diluyente de muestras:

Un vial (11,5 ml) de solución química definida conteniendo proteínas y azide de sodio en buffer de fosfato.

3.6 Una solución de sustrato:

Un vial (7,5 ml) que contiene peróxido de hidrógeno de urea. Conservar a 2-8 C.

3.7 Solución de cromógeno B:

Un vial (7,5 ml) contiene estabilizada 3,3' - 5,5' tetrametilbencidina (TMB). Conservar a 2-8 C.

3.8 Solución de Stop:

Un vial (7,5) que contiene 1.0 M H₂ SO₄. Listo para usar.

3.9 Solución de lavado (20x conc.):

Un vial (50 ml) que contiene buffer fosfato salino.

Preparación de la solución de lavado:

En un becker graduado hasta 1000ml de capacidad, vierta el contenido completo de la solución concentrada de lavado (50 ml). Enjuague el vial con agua destilada y vierta también esta agua destilada en un Becker hasta un volumen total de 1000ml. Transfiera el contenido del Becker en una botella de 1500ml para su conservación.

4.0 EQUIPOS Y MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUPLIDOS

4.1. Micropipetas de precisión y tips.

4.2. Incubador (+37°C).

4.3. Lavador automático de placas.

4.4. Lector de placas para medir la absorbancia a 450 nm.

4.5. Toalla o papel absorbente.

4.6. Agua destilada.

4.7. Mezclador vortex.

5.0 PRECAUCION PARA LOS USUARIOS

5.1. Solo para uso de diagnostico in-vitro.

5.2. No debe utilizar este kit luego de la fecha de expiración.

5.3. No mezcle componentes de kits con diferentes números de lotes.

5.4. Evite contaminación microbiana de reactivos.

5.5. No pipete reactivos con la boca y no fume o coma mientras muestras.

5.6. Use guantes durante todo el proceso y evite derrame de reactivos o especímenes.

5.7. Limpie los derrames utilizando solución de hipoclorito.

5.8. Descontamine todos los desechos líquidos y sólidos antes de botarlos.

6.0 COLECTA DE ESPECIMENES Y PREPARACION

El suero debe ser preparado a partir de una muestra de sangre obtenida por técnicas médicas aceptables. Tanto suero como plasma pueden ser usadas en esta prueba. Remueva suero o plasma del coagulo o células de la sangre tan pronto como sea posible para evitar hemólisis. Muestras congeladas a -20 C más frías deben utilizarse. Evite descongelar y congelar de forma repetitiva.

7.0 COLECTA DE ESPECIMENES Y PREPARACION

Kits de prueba sin abrir deben almacenarse a 2-C desde que la reciba y la placa de microtitulación se debe mantener en una bolsa sellada para minimizar la exposición a la humedad del aire. Use los reactivos lo más pronto posible después de abrir el paquete.

8.0 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

8.1. Llevar todos reactivos y muestras a temperatura ambiente (15°C-30°C) antes de comenzar el ensayo. Agitar suavemente antes de usarlo. Ajuste de la incubadora a 37 ° C, si es necesario.

8.2. Anote el número relativo de las muestras y los pocillos en la hoja de datos. Un pocillo en el blanco, otros cinco para los controles y un pocillo para cada muestra. Si el experimento no necesita toda la placa, quite las tiras restantes del portador de tiras y almacene las tiras no utilizadas en la bolsa de ziplock (incluido en el kit) que contiene desecante.

8.3 Reserva un pocillo en el blanco, añadir 100ul del control negativo para cada uno de los tres pocillos, 100ul del control positivo para cada uno de los dos pocillos y 100ul de diluyente de la muestra a los otros pocillos, y luego con una pipeta tome 10ul de la muestra a los pocillos diluyentes de la muestra, de acuerdo con el siguiente esquema:

1 A:	Blanco
2A, 3 A, 4 A:	Suero de control negativo
5A, 6A:	Suero control positivo
7A:	Muestras

Notas: utilizar tips individuales para cada pipeta para evitar contaminaciones cruzadas.

Si más de 2 o 3 carreras por la placa son necesarios y son utilizados equipos confiables (pipetas, lavadores, etc., se puede pipetear el control negativo por duplicado y el control positivo en el singleton.

8.4. Incubar las placas en una incubadora de 37 ° C durante 30 minutos.

8.5. Al final de la incubación, lavar las tiras 6 veces con la solución de lavado, ya sea manualmente o con lavadora automática.

Después del lavado final, asegúrese de que toda solución es perfectamente removida de cada pocillo.

Nota: Un proceso de lavado adecuado es esencial para la buena realización de los ensayos.

8.6 Añadir dos gotas (100 ul) de conjugado enzimático a cada pocillo (excepto el pocillo en el blanco). Mezclar suavemente por agitación de la placa de microtitulación en banco plano, e incube durante 30 minutos a +37 ° C.

8.7 Lavar la placa 6 veces como en el paso 5.

8.8 Dispense 50 ul de sustrato cromógeno A y B, incluyendo 1A. Mezcle horizontal e incube durante 10 minutos a +37 ° C (evite la exposición directa a la luz solar).

8.9 Detener la reacción añadiendo 50 ml de reactivo de bloqueo a cada pocillo (incluido el blanco) en el mismo orden adoptado para la adición de la solución de cromógeno / sustrato.

8.10 Después de añadir la solución de bloqueo, lea el color que aparece en el lector de microplacas a 450 mn. La lectura debe hacerse dentro de los 30 minutos del bloqueo.

Nota: El lector debe ser borrado a 450 nm frente al blanco. Es recomendada la medición de absorbancia bicromática con una longitud de onda de referencia de 620nm cuando esté disponible.

8.11 Registre los resultados de absorbancia en una hoja de datos. Incluya el número de lote del kit, la fecha, el operador y las notas sobre la corrida. Si una copia impresa de la lectura de la absorbancia está disponible, se debe adjuntar a la hoja de datos.

9.0 PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Las placas de microtitulación pueden ser lavadas manual o automáticamente, en cuyo caso es absolutamente necesario para programar el lavador de microplacas de acuerdo a las siguientes direcciones:

Aspirar la mezcla de incubación de los pocillos de la primera tira y dispense 350 ml de solución de lavado. Poco después, realice el proceso de otras tiras de la misma manera. Repita este procedimiento 5 veces más, para un total de 6 ciclos, asegurándose de que la solución de lavado se queda en los pocillos durante 30 segundos (tiempo de remojo) en cada ciclo. Un procedimiento de lavado adecuado es esencial para una buena realización de los ensayos.

10.0 PRUEBA DE LA VALIDEZ

La prueba es válida si:

- La media del control negativo es menor que 0,10 O.D.
- La media del control positivo es igual o superior a 0.6 O.D.

11.0 DETERMINACION DEL VALOR DE CUT-OFF E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

11.1. Valor del cut-off= 0.1 + NC (Media Control Negativo)
Si el valor de la DO del control negativo es inferior a 0.05, este

debe ser reportado como 0.05. Si el valor es más de 0.05, debe ser reportado como el valor real de OD medido.

Ejemplo: NCX = 0,032

Cut-off = 0.105

Cualquier muestra, en la que la absorbancia es igual o superior al valor de corte, se considera positiva para el HCV. Cualquier muestra, en la que la absorbancia es menor que el valor calculado de cut-off, se considera negativa para el HCV.

12.0 LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Como en otros inmunoensayos sensibles, existe la posibilidad de que reacciones no repetibles pueden ocurrir debido a un inadecuado lavado. Así que procure aspirar el pocillo o deshacerse de todo el contenido por completo antes de añadir la solución de lavado.

12.2 Al igual que con todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse sólo en los resultados de una sola prueba. Es necesaria una evaluación completa de un médico para obtener un diagnóstico final.

12.3 La prueba es para uso en investigación, elaboración de productos derivados y de exportación.

13.0 REFERENCIAS

13.1 Kuo, G, Choo 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.

13.2 Esteban JL, 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.

13.3 Miyamura T, Saito I, Katayama T, et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus Cdna: application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA 1990.87:983-7.

13.4 Estaban, JI, Estaban R, Viladmiu L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk Groups in Spain. Lancet 1989.2:294-7.

13.5 Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Q-L. Molecular Biology of the Hepatitis C viruses for diagnosis, Development, and Control of Viral Disease. Hepatology 1991, 14:381-8.

13.6 Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo Q-L, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectivity followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. N Engl J Med 1989.321:494-1500.

ATLAS MEDICAL

PPI603A01