

Anti-HCV ELISA 3ª geração  
SD HCV ELISA 3.0  
Manual de Instrução

**Explicação do teste**

SD HCV ELISA 3.0 contém um microplaca, pré-revestida com os antígenos recombinantes de HCV (Core, NS3, NS4 e NS5) nos poços. Durante a primeira incubação, anticorpos anti-HCV presentes no soro do paciente são ligados aos antígenos recombinantes presentes nos poços da microplaca. Depois desta incubação, todo material não ligado é removido por lavagem e aspiração. Então, o conjugado enzimático é ligado ao anti-HCV do paciente. Depois desta etapa de incubação, todo material não ligado é removido por lavagem e aspiração. A atividade enzimática residual encontrada nos poços é diretamente proporcional à concentração de anticorpos anti-HCV presentes na amostra do paciente, e é evidenciada através da incubação da fase sólida com o substrato TMB. A leitura colorimétrica se dá através de espectrofotômetro a 450 nm. SD HCV ELISA 3.0 é um teste imunoenzimático de sanduíche indireto para detecção qualitativa de anticorpos contra HCV. Este teste destina-se ao uso profissional e deve ser utilizado como recurso auxiliar no diagnóstico da hepatite C.

**Materiais fornecidos**

Material/Reagente	Descrição	Kit para 96T	Kit para 480T
Microplaca sensibilizada	96 poços sensibilizados com antígeno recombinante HCV core, NS3, NS4 e NS5. Selada em envelope aluminizado.	1 placa	5 placas
Conjugado enzimático	Anti-IgG humano conjugado a HRPO. Contém PROCLIN 300 0,05% como conservante. Pronto para uso.	1 frasco com 20 ml	1 frasco com 100 ml
Diluinte de amostra	Tampão fosfatado, soro bovino e estabilizadores. Contém PROCLIN 300 0,05% como conservante.	1 frasco com 20 ml	1 frasco com 100 ml
Controle positivo	Soro humano anti-HCV positivo. Contém PROCLIN 300 0,05% como conservante.	1 frasco com 0,5 ml	1 frasco com 2 ml
Controle negativo	Soro humano anti-HCV negativo. Contém PROCLIN 300 0,05% como conservante.	1 frasco com 0,5 ml	1 frasco com 2 ml
Substrato TMB A	Acetato de sódio, peróxido de hidrogênio e gentamicina. Antes de usar, diluir 1:1 com o substrato TMB B.	1 frasco com 10 ml	1 frasco com 50 ml

Substrato TMB B	Tetrametilbenzidina e ácido hidrocloreídrico. Antes de usar, diluir 1:1 com o substrato TMB A.	1 frasco com 10 ml	1 frasco com 50 ml
Solução de lavagem 20 X concentrada	Tween 20 e PROCLIN 300 0,05% como conservante. Diluir 50 ml da solução concentrada em 1 litro de água destilada antes de usar. Havendo cistais na solução, re-suspender a mesma a 37 graus C por alguns minutos.	1 frasco com 50 ml	1 frascos com 100 ml
Solução de parada	Ácido sulfúrico 1,0 N	1 frasco com 20 ml	1 frasco com 100 ml
Adesivo selador para placa			
Instruções de uso			

**Precauções**

Para obter resultados reproduzíveis, as regras abaixo devem ser seguidas:

- Apenas para uso diagnóstico *in vitro*;
- Não misturar reagentes de diferentes lotes;
- Utilize óculos de proteção, a fim de evitar contaminação por íons metálicos e substâncias oxidativas;
- Utilize luvas descartáveis durante todo o ensaio e enquanto manuseia substâncias potencialmente infectantes;
- O substrato e solução de parada devem ser manuseados com cuidado. Evite contato com a pele, olhos e membranas mucosas. Em caso de acidente, lave com água corrente em abundância.

**Coleta e armazenagem das amostras**

- Colete o sangue total por venipunção utilizando anticoagulante;
- Centrifugue o sangue total para obter amostras de soro ou plasma;
- Se a amostra não for imediatamente testada, ela deve ser armazenada entre 2 a 8 graus Celsius. Para períodos de armazenagem superior a três dias, o congelamento é recomendado. As amostras devem ser trazidas à temperatura ambiente antes do uso.
- Amostras com precipitado podem causar resultados inconsistentes. Estas amostras devem ser clarificadas antes do uso.

**Procedimento**

- Prepare 3 poços da microplaca para a realização de controle negativo e mais dois poços para a realização de controle positivo. Prepare os poços das amostras.
- Pipetar 100 ul de diluinte de amostra em cada poço.
- Adicionar 10 ul de controle negativo em cada um dos 3 poços destinados ao controle negativo; 10 ul de controle positivo nos 2 poços destinados ao controle positivo e 10 ul de amostra nos poços destinados à realização dos testes.
- Cubra a microplaca com selo adesivo e homogenize a mesma gentilmente por 20 a 30 segundos. A homogeneização é muito importante para a reprodutibilidade dos resultados.
- Incubar a microplaca a 37 C durante 30 minutos.

- Lavar os poços 5 vezes com 350 ul de solução de lavagem previamente preparada, deixando que a solução de lavagem permaneça em contato com os poços por pelo menos 10 segundos. Aspire bem todo o conteúdo dos poços.

OBS: a etapa de lavagem é fundamental para o bom desempenho do teste. Realize cuidadosamente de acordo com as instruções acima.

- Pipetar 100 ul de conjugado enzimático em cada poço.
- Cobrir a placa com o selo adesivo.
- Incubar a 37 C por 30 minutos.
- Lavar os poços com solução de lavagem previamente preparada por 5 vezes. Adicione 350 ul de solução de lavagem, deixe que a mesma permaneça em contato com o poço por pelo menos 10 segundos e então aspire ao conteúdo do poço.
- Adicione 100 ul de solução substrato previamente preparada em cada poço.
- Incubar os poços por 10 minutos em temperatura ambiente.
- Pipetar 100 ul de solução de parada em cada poço.
- Ler a absorbância dos poços com um espectrofotômetro bicromático a 450nm com referência 620nm. A leitura deve estar completa até 1 hora depois do término do ensaio.

**Interpretação dos resultados**

Validação do teste

Os valores individuais de absorbância para os controles podem ser utilizados se possuírem os seguintes valores:

Controle negativo: o valor deve ser maior ou igual a -0,010 e menor ou igual a 0,200

Controle positivo: maior ou igual a 1,000,00.

Se uma das absorbâncias do controle negativo estiver fora das especificações, este valor não deve ser usado para a interpretação dos resultados (rejeitado). Ambos os valores do controle positivo devem estar dentro das especificações. Se os valores não estiverem dentro das especificações, o teste deve ser refeito.

Avaliação

Calcular a média de absorbância dos controles negativos, e então calcular o valor do cut-off adicionando 0,400 a esta média obtida:

A (média dos controles negativos)+0,400= valor cut-off

As amostras então devem ser classificadas da seguinte maneira:

Valor ABS amostra menor valor cut-off= anti HCV negativo

Valor ABS amostra maior valor cut-off= anti HCV positivo

Amostras com valores iguais ou semelhantes ao valor do cut-off devem ser re-testadas em duplicata. Se no re-teste os valores continuarem iguais ou semelhantes ao cut-off, a amostra deve ser submetida a um teste confirmatório.

**Limitações e interferências**

- O procedimento do teste, precauções e interpretação dos resultados devem ser seguidos estritamente como descritos nesta bula.

Amostras

- Amostras contendo azida sódica não afetam os resultados.
- Amostras pasteurizadas (não menos que 10 horas a 60 graus Celsius) podem ter suas propriedades diminuídas, não devendo ser utilizadas.
- Amostras inativadas (1 hora a 56 graus Celsius) não afetam os resultados dos testes.
- Anticoagulantes como heparina, citrato e EDTA não interferem nos resultados dos testes.
- Amostras hemolíticas devem ser centrifugadas antes do uso para evitar interferências por constituintes celulares.
- Fatores reumatóides presentes podem elevar a atividade das amostras.
- Amostras lipêmicas e ictericas não afetam os resultados dos testes.

Este teste detecta anticorpos de HCV em soro ou plasma, e deve ser utilizado como procedimento de triagem.

A falha em adicionar amostras e/ou no procedimento ocasionada por diversos motivos pode causar resultados falso-negativos. A repetição do teste deve ser considerada quando há evidências clínicas de infecção.

#### Armazenagem e estabilidade

Armazenar entre 2 a 8 C. O kit é válido até a data impressa na embalagem e no rótulo de cada componente quando fechado em sua embalagem original.

#### Estabilidade dos reagentes depois de abertos

Reagente		Armazenagem	Estabilidade
Microplaca	Depois de aberta	2 a 8 C	1 mês
Conjugado enzimático	Depois de aberto	2 a 8 C	3 meses
Conjugado preparado	Diluição 1:101	Temperatura ambiente	4 horas
Diluyente de amostra	Depois de aberto	2 a 8 C	3 meses
Controle negativo	Depois de aberto	2 a 8 C	3 meses
Controle positivo	Depois de aberto	2 a 8 C	3 meses
Solução Substrato preparada	Diluição 1:101	Temperatura ambiente, recipiente fechado e protegido da luz.	4 horas
Diluyente de Substrato	Depois de aberto	2 a 8 C	Data de validade
Solução de lavagem conc.	Depois de aberto	2 a 8 C	Data de validade
Solução de lavagem reconstituída	Diluição 1:20	2 a 8 C Temperatura ambiente	3 meses 30 dias
Solução de parada	Depois de aberta	Temperatura ambiente	Data de validade

#### Características do desempenho.

O teste do SD HCV ELISA 3.0 foi testado com as amostras clínicas positivas e negativas testadas por um outro kit anti-HCV ELISA terceira geração. Os resultados demonstraram elevado nível de exatidão.

Referência	SD HCV ELISA 3.0		Resultados	
	Positivo	Negativo		
Kit Comercial	Positivo	207	1	208
ELISA	Negativo	2	498	500
Resultados		209	499	708

- Sensibilidade relativa: 99,5%
- Especificidade relativa: 99,6%

#### Bibliografia e leitura sugerida

- 1) Arash G., Gzeslaw W., Chão Lin, Stephen M. Feinstone, and Charles M. Rice: Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage products. Journal of Virology, March. 1993, p. 1385-1395.
- 2) Young Gyu Cho, Min kyung Yi, kyung Lib jang, Chang Min Kim and Young Chul sung: Cloning and Overexpression of the Highly Immunogenic Region of HCV Genome from Korean Patients. Mol. Cells, Vol. 3, 4-7 – 416.

3) S. Osborne, E. Cecconato, S. griva, F. Garetto, R. Calogero, C. Rosa and F. Bonelli: Expression in E.Coli and purification of a chimeric p22-NS3 recombinant antigen of Hepatitis C Virus (HCV). Federation of European Biochemical Societies, Volume 324, number 3, 253-257.

4) Robert R., Kent T., Kim Berger, Carol Kuo, Barbara G.: Characterization of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Complexes expressed by Recombinant Vaccina Viruses. Journal of Virology, Nov. 1993, p.653-6751.

5) A. Yoshikawa, K. Takahashi, S. Kishimoto: Serodiagnosis of hepatitis C virus infection by ELISA for antibodies against the putative core protein (p20c) expressed in Escherichia coli. Journal of Immunological Methods, 148 (1992) 143-150.

#### Produzido por: STANDARD DIAGNOSTICS INC.

34, Pajang-dong , Jangan-ku, Suwon-si  
Kyonggi-do  
Coréia  
<http://www.standardia.com>

#### Importado e distribuído por: RZ DE OLIVEIRA DIAGNÓSTICA - EPP

Rua Campevas, 627  
CEP.05016-010 - São Paulo - SP  
CNPJ 05.328.040/0001-80

#### Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA 80313040031  
Téc. Resp. Dra. Renata Zuculin de Oliveira - CRF-SP 37986  
**POTENCIALMENTE INFECTANTE**  
**CONSERVAR A TEMPERATURA 2°C A 8°C**

#### PARA DESCARTE, CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO

#### SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Quaisquer dúvidas técnicas no manuseio deste kit ou no seu procedimento, contatar a nossa **ASSESSORIA CIENTÍFICA**.

Atendimento ao consumidor - Fone (011)-3871-0095

