



# DIA (Dot Immuno Assay)\*

## HIV 1+2

Inmunoensayo sobre soporte sólido para la detección de anticuerpos contra los virus de inmunodeficiencia humana HIV-1, HIV-1 grupo O y HIV-2

### SIGNIFICACION CLINICA

Los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2) causantes del SIDA, son transmitidos principalmente por contacto sexual o a través de sangre o productos contaminados derivados de la sangre.

En individuos infectados con estos virus aparecen anticuerpos, como respuesta del sistema inmunitario a la invasión viral. Estos anticuerpos no son protectores y no confieren inmunidad, pero por ser marcadores tempranos de la infección, su detección constituye la base del estudio de la patología. El presente equipo ha sido desarrollado para detectar conjuntamente la presencia de los anticuerpos anti-HIV-1, anti-HIV-1 grupo O y anti-HIV-2.

### FUNDAMENTOS DEL METODO

La muestra diluida se pone en contacto con el soporte sólido en forma de peine en el cual se encuentran inmovilizados péptidos sintéticos de transmembrana de HIV-1 y HIV-2. Si la muestra contiene anticuerpos anti-HIV-1, anti-HIV-1 grupo O o anti-HIV-2 se formará un inmunocomplejo que quedará unido al soporte. Luego de un lavado, se incuba el soporte con un conjugado de proteína A-oro coloidal (Revelador). La proteína A se une al fragmento Fc de los anticuerpos. La aparición de una mancha rojiza en el lugar donde se encuentran depositados los péptidos sintéticos es indicativo de que se formó el inmunocomplejo y por lo tanto de la presencia en la muestra de anticuerpos anti-HIV-1, anti-HIV-1 grupo O o anti-HIV-2.

### REACTIVOS PROVISTOS

**Antígeno:** soporte sólido en forma de peine, conteniendo inmovilizados en cada "diente" péptidos sintéticos de antígenos de transmembrana de HIV-1 y HIV-2 (parte opaca del peine).

**Diluyente de Muestras:** solución fisiológica con tensioactivo no iónico, pH 7,3.

**Buffer de Lavado concentrado:** cloruro de sodio 1,4 mol/l en buffer fosfatos 100 mmol/l y tensioactivo no iónico 0,1 g/l.

**Revelador:** proteína A de *Staphylococcus aureus* conjugada con oro coloidal.

**Control Positivo:** dilución de suero inactivado, reactivo para anticuerpos anti-HIV.

**Control Negativo:** dilución de suero inactivado, no reactivo.

### INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Antígeno:** listo para usar. Al cortar el sobre, tener la precaución de no cortar con la tijera los peines o el sobre con desecante.

**Diluyente de Muestras:** listo para usar.

**Buffer de Lavado:** a baja temperatura los componentes del reactivo pueden precipitar. En tal caso, colocar en baño de agua a 37°C unos minutos, mezclando luego por inversión. Diluir 1+7 con agua destilada (1 parte Buffer de Lavado concentrado + 7 partes de agua destilada). Tener en cuenta que al realizar la técnica el Buffer de Lavado se prepara una sola vez y se utiliza en los dos lavados. Luego, debe descartarse la solución agregándole previamente 5 ml de hipoclorito de sodio al 5%.

**Revelador:** listo para usar.

**Control Positivo:** listo para usar.

**Control Negativo:** listo para usar.

### PRECAUCIONES

- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Los controles se encuentran inactivados. Sin embargo, deben emplearse como si se tratara de material infeccioso.

- Los sueros controles han sido examinados para HBsAg, encontrándose negativos.

- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.

- Si los pocillos de la policubeta no se utilizan en su totalidad, descartar el líquido de los pocillos utilizados en un recipiente para desechos biológicos que contenga 5% de hipoclorito sódico. Luego golpear la policubeta varias veces sobre papel absorbente que se descartará como residuo biológico y lavarla con una solución alcohólica al 50%. Secarla y cubrir los pocillos empleados en el ensayo con cinta autoadhesiva para evitar su reutilización.

- No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.

- No emplear reactivos de otro origen.

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

- El Buffer de Lavado contiene azida sódica.

### ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

**Buffer de Lavado:** preparar en el momento de usar.

**Antígeno:** los peines con antígeno inmovilizado se proveen cerrados y con desecante. No abrir el envoltorio hasta el momento de usar ni antes que hayan tomado temperatura ambiente, para evitar la humectación del contenido. Los

peines no utilizados deben conservarse dentro del sobre con el desecante, cerrado con cinta autoadhesiva y a 2-10°C. Los peines conservados en estas condiciones pueden ser utilizados dentro de los 2 meses posteriores mientras no se supere la fecha de vencimiento del equipo.

## MUESTRA

Suero o plasma

- a) Recolección:** obtener la muestra de la manera usual.
- b) Aditivos:** si se emplea plasma puede utilizarse cualquier anticoagulante de uso corriente en la práctica transfusional.
- c) Sustancias interferentes conocidas:** la hemólisis puede ser causa de resultados erróneos.
- d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** las muestras no diluidas pueden conservarse durante no más de 4 horas a temperatura ambiente y hasta 7 días refrigeradas (2-10°C). Para conservación por períodos más prolongados deben ser congeladas a -20°C o menos. Los congelamientos y descongelamientos reiterados pueden producir falsos positivos y falsos negativos.
- Si las muestras deben ser transportadas, embalar de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de materiales infecciosos.

## MATERIAL REQUERIDO

### 1- Provisto

- policubetas
- recipiente para lavado

### 2- No provisto

- micropipeta de 100 ul
- reloj alarma o cronómetro
- material volumétrico adecuado

## CONDICIONES DE REACCION

- Tiempo total de reacción: 20 minutos
- Temperatura de reacción: temperatura ambiente (> 22°C). Si la temperatura ambiente es menor a 22°C, realizar la reacción en estufa a 37°C.
- Volumen de muestra: 100 ul

## PROCEDIMIENTO

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba. Una vez iniciado el análisis completarlo sin interrupción. Procesar simultáneamente 1 Control Positivo (en el "diente" del extremo derecho del peine) y 1 Control Negativo (en el "diente" del extremo izquierdo del peine). Luego proceder de la siguiente forma:

### Preparación del material:

Colocar 2 gotas de Diluyente de Muestras en cada pocillo a utilizar de la policubeta. En cada uno de estos pocillos colocar 100 ul de Muestra o Controles. Tener la precaución de colocar los mismos en el fondo de los pocillos para asegurarse de no producir salpicaduras que puedan contaminar pocillos vecinos. Mezclar aspirando con la micropipeta varias veces el contenido de cada

pocillo a fin de asegurar una correcta homogeneización. En la hilera de pocillos contigua a la utilizada para las muestras colocar 3 gotas de Revelador por pocillo a utilizar. Preparar el Buffer de Lavado como se explicó en INSTRUCCIONES PARA SU USO. Colocar el Buffer de Lavado en el recipiente destinado a tal fin, teniendo la precaución de no formar espuma. Este recipiente debe permitir que los dientes del peine queden completamente sumergidos.

### Realización de la prueba:

Abrir cuidadosamente el envoltorio y extraer el número de peines necesarios para el ensayo. Conservar los restantes como se indicó en ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO. Colocar la identificación de cada muestra directamente en la parte superior del diente correspondiente.

Importante: no tocar en ningún momento las zonas reactivas del peine ya que esto puede ocasionar resultados erróneos. Colocar el peine en los pocillos de la policubeta que contienen las diluciones de muestras y controles e incubar durante exactamente 10 minutos a temperatura ambiente. Extraer el peine de los pocillos y escurrir las puntas de los dientes tocando sobre papel absorbente. No tocar el papel con la zona reactiva de los dientes.

Manteniendo el peine en posición vertical con los dientes hacia abajo y la zona reactiva de frente al operador sumergir el peine en el Buffer de Lavado. El lavado debe realizarse repitiendo 10 veces un movimiento del peine constante, lento y suave de adelante hacia atrás, sin tocar con el mismo las paredes del recipiente. Escurrir nuevamente las puntas de los dientes como se explicó anteriormente.

Insertar el peine en los pocillos que contengan el Revelador e incubar a temperatura ambiente durante exactamente 10 minutos. Tener en cuenta que la reacción positiva se intensifica si se agita durante el revelado, por ejemplo en un agitador de Kline.

Al finalizar la incubación repetir el lavado como se indicó más arriba, empleando el mismo Buffer de Lavado que se usara anteriormente.

Colocar el peine sobre una superficie limpia con la zona reactiva hacia arriba y dejar secar completamente antes de observar los resultados.

El color del "dot" se intensifica al secarse. Efectuar la lectura de los resultados bajo luz natural o fluorescente. No emplear lámpara incandescente.

## ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable indefinidamente por lo que el soporte puede conservarse para referencias futuras de los resultados.

## CRITERIOS DE VALIDACION DE LA CORRIDA

La corrida se considera válida si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

- a) No debe aparecer color detectable en el diente correspondiente al Control Negativo.  
 b) El Control Positivo debe ser nítidamente detectable.  
 Si alguna de estas condiciones no se cumple, repetir la corrida, empleando un nuevo equipo de reactivos.

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

- El kit está diseñado para usar con muestras puras. No utilizar muestras diluidas debido a que las mismas pueden ocasionar resultados falsos negativos.
- Debe recordarse que la presencia de anticuerpos anti-HIV en el suero **NO** es diagnóstico de SIDA. Los resultados repetidamente reactivos deben corroborarse por métodos de referencia como Western blot.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por HIV.
- Pueden obtenerse resultados falsos positivos en las siguientes situaciones: enfermedades autoinmunes, tuberculosis, lupus eritematoso sistémico, embarazo, vacunación contra hepatitis B y otras inmunizaciones, hemodiálisis, enfermedad hepática y otras enfermedades.

### PERFORMANCE

- En un estudio conducido por el Global Program on AIDS (GPA) perteneciente a la World Health Organization (WHO) se evaluó un panel de 600 sueros humanos y 8 paneles de seroconversión. Los datos obtenidos se compararon con Western blot como método de referencia, encontrándose una sensibilidad del 100%, una especificidad del 99,7% y una reproducibilidad del 99,4%.
- En un estudio realizado sobre 425 muestras provenientes de pacientes del Instituto de Infectología Emilio Ribas de San Pablo, se obtuvo una sensibilidad del 99,5%, una especificidad del 96,4% y una eficiencia del 97,8%.
- En un estudio realizado sobre dos muestras de HIV-1 grupo O, B7-2705-0001 y JP8-2707-0001, de Boston Biomedica Inc., fueron detectadas las 2 muestras.

### INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Una vez finalizada la prueba y cuando el peine se haya secado completamente, observar los resultados sobre una superficie blanca, a ojo descubierto y con buena iluminación.

**Muestra Reactiva:** aparición de una mancha coloreada (rosa tenue a rojo) en la zona reactiva del peine. Siempre que este círculo esté presente, aún cuando el color sea de menor intensidad que el Control Positivo, indica muestra reactiva.

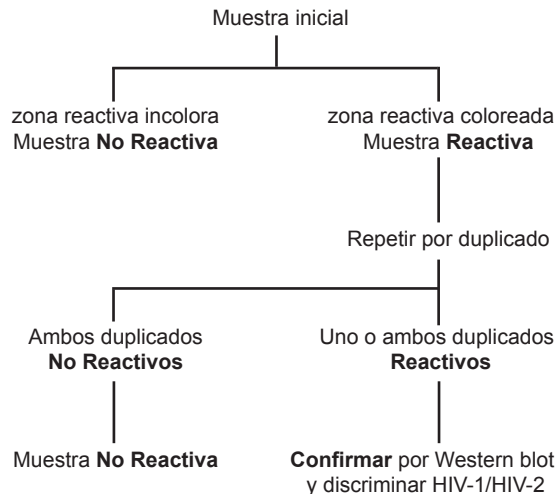
**Muestra No Reactiva:** no se observa coloración en la zona reactiva del peine.

Toda prueba inicialmente reactiva debe ser ensayada nuevamente por duplicado. Si uno o ambos de los duplicados son Reactivos, se presume que la muestra contiene anticuerpos anti-HIV-1 o anti-HIV-2.

Si ambos duplicados resultan No Reactivos se considera el primer resultado como falsamente positivo, presumiéndose que la muestra no contiene anti-HIV-1 ni anti-HIV-2.

Toda muestra Reactiva debe ensayarse nuevamente empleando un método de referencia y realizar la discriminación para HIV-1/HIV-2.

### Esquema de interpretación



### PRESENTACION

Equipo para 48 determinaciones (Cód. 1723201).

### BIBLIOGRAFIA

- Gallo, R.C. y cols. Science 224:500 (1984).
- Montagnier, L. - Ann. Inst. Pasteur/Virol., 138, 3-11 (1987).
- Centers for Disease Control - Morbidity and Mortality Weekly Report 36/31 (1987).
- Lossa, G.R. - Acta Bioq. Clín. Latinoam. XXI/1:47-65 (1987).
- NotiWiener N°76, pág. 1, abril 1990.
- Bansal, J.; Constantine, N.; Zhang, X.; Kataaha, P. - VII<sup>th</sup> International Conference on AIDS in Africa, 1992.
- Sato, N.; Rojkin, F.; Lorenzo, L.; Piovesana, M.; Beristain, C.; Takeda, A. - XXVII Congreso Brasileiro de Patología Clínica San Pablo, Brasil - Setiembre 1993.
- Lorenzo, L.E. ; Rojkin, L.F. ; Beristain, C.N. - 46<sup>th</sup> National Meeting, AACC, 17-21 julio, 1994, New Orleans, LA, USA - Clin. Chem. 40/60:1036 Abs., 254, 1994.
- Rojkin, L.F.; Lorenzo, L.E.; Beristain, C.N. - Resúmenes 1° Congreso Argentino de Biotecnología, II° Feria Congreso Latinoamericano de Biotecnología, 6-8 junio, 1994, Buenos Aires, Argentina, pag. 70.
- Report of the WHO evaluation of the DIA (Dot Immuno Assay) HIV 1+ 2 (Wiener lab. - Argentina). Institute of Tropical Medicine, Department Infection and Immunity, WHO Collaborating Centre on AIDS, Division of Microbiology - Antwerpen, 24 February, 1995.
- Celum C., Coombs R., Jones M. et al. - Arch. Intern. Med. 154:1129 (1994).
- Barthel H., Wallance D. - Semin. Arthritis Rheum. 23:1 (1993).
- Doran T. and Parra E. - Arch. Fam. Med. 9/9:924 (2000).
- Centers for Disease Control - MMWR 50/RR19:59 (2001).

## EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

<b>Antígeno</b>	<b>Diluyente</b>	<b>Muestra</b>
Antígeno	Diluyente de Muestras	
<b>Revelador</b>	<b>Buf. Lavado</b>	<b>Conc.</b>
Revelador	Buffer de Lavado concentrado	
<b>Control +</b>	<b>Control -</b>	
Control Positivo	Control Negativo	


Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

**EC REP** Representante autorizado en la Comunidad Europea

<b>IVD</b>	Uso diagnóstico "in vitro"
	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Fecha de caducidad
	Límite de temperatura (conservar a)
	No congelar
	Riesgo biológico
	Volumen después de la reconstitución
<b>Cont.</b>	Contenido
<b>LOT</b>	Número de lote
	Elaborado por:
	Nocivo
	Corrosivo / Caústico
	Irritante
	Consultar instrucciones de uso
<b>Calibr.</b>	Calibrador
<b>CONTROL</b>	Control
<b>CONTROL +</b>	Control Positivo
<b>CONTROL -</b>	Control Negativo
<b>REF</b>	Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
Cert. N°: 5181/04



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina