



HIV 1+2

ELISA 3ª Generación

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti- HIV-1 y anti HIV-2 en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

Los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2) son los agentes causales del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Estos retrovirus son transmitidos por la exposición a ciertos fluidos corporales infectados, principalmente secreciones genitales y sangre o productos contaminados derivados de la sangre y por pasaje a través de la placenta. La evidencia serológica de la infección por HIV-1 y HIV-2 puede ser obtenida determinando la presencia de antígenos y anticuerpos en el suero de individuos en los que se sospecha la infección. Los antígenos pueden generalmente ser detectados en la fase aguda y durante la fase sintomática de la enfermedad. Los anticuerpos pueden ser detectados a lo largo de toda la infección, comenzando en la fase aguda o inmediatamente después de ella.

El ensayo HIV 1+2 ELISA 3ª Generación está diseñado para detectar anticuerpos contra HIV-1, HIV-1 grupo O y HIV-2.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Los pocillos de la policubeta están recubiertos con antígenos recombinantes de los virus HIV-1 y HIV-2. La muestra se incuba en los pocillos. Si la muestra contiene anticuerpos contra HIV-1 o HIV-2, los mismos se unirán a los antígenos sensibilizados en la placa. El material no unido es removido por lavado. En el paso siguiente se agrega el conjugado que contiene los mismos antígenos de la placa conjugados a peroxidasa. Estos se unirán a los anticuerpos si estaban presentes en la muestra. El conjugado no unido se remueve por lavado. A continuación se agrega una solución conteniendo tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno. Las muestras reactivas desarrollan color celeste que vira al amarillo cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico.

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removibles con 96 pocillos recubiertos con antígenos recombinantes de HIV-1 y HIV-2.

Conjugado: antígenos recombinantes unidos a peroxidasa. Color rojo.

Revelador: solución de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado Concentrado: buffer salino con tensioactivo (25x). Color verde.

Control Positivo: suero humano inactivado conteniendo anticuerpos anti-HIV-1 y HIV-2. Color naranja.

Control Negativo: suero humano no reactivo inactivado. Color amarillo.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada o desionizada.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas para medir los volúmenes indicados
- Tips descartables
- Material volumétrico para preparar las diluciones indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorbente
- Guantes descartables
- Reloj alarma o cronómetro
- Hipoclorito de sodio
- Sistema de lavado de policubetas (manual o automático)
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas

PRECAUCIONES

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y anticuerpos contra el virus de hepatitis C (HCV), encontrándose no reactivos. Sin embargo, se recomienda manipularlos con las precauciones requeridas para muestras potencialmente infecciosas.
- Al descartar los materiales empleados en el ensayo se deben tratar 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.
- No intercambiar reactivos de distintos lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Evitar tocar las paredes de los pocillos con los tips.
- No utilizar elementos metálicos que puedan entrar en contacto con los reactivos.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso. No usar baño de agua.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos u otras fuentes entren en contacto con los reactivos, ya que el hipoclorito afecta la reacción.
- Evitar contacto del ácido sulfúrico (Stopper) con piel y mucosas. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280:

Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

- Evitar el derrame de líquidos y formación de aerosoles.
- No pipetear con la boca. Usar guantes descartables y protección en los ojos durante la manipulación de las muestras y reactivos del ensayo.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa vigente.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Es importante que todo el material utilizado para la preparación de los reactivos esté limpio y libre de detergente e hipoclorito.

Buffer de Lavado: a baja temperatura los componentes del reactivo concentrado pueden precipitar. En tal caso, llevar la solución a 37°C hasta disolución completa. Para la obtención del buffer de lavado listo para usar, diluir una parte de Buffer de Lavado Concentrado (25x) con 24 partes de agua destilada o desionizada. Ej.: 20 ml con 480 ml para una policubeta.

Policubeta sensibilizada, Conjugado, Revelador, Stopper, Control Positivo y Control Negativo: listos para usar.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado Concentrado y Stopper: se pueden conservar a una temperatura entre 2 y 25°C.

Buffer de lavado (1x): una vez diluido es estable 3 meses a temperatura entre 2 y 25°C.

Policubeta sensibilizada: no abrir el sobre hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente, de lo contrario se favorecerá la condensación de humedad sobre la superficie de los pocillos. Las tiras no utilizadas deben conservarse entre 2-10°C dentro del sobre con desecante bien cerrado. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 4 meses posteriores mientras no supere la fecha de vencimiento indicada en la caja.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener la muestra de la manera habitual.

b) Aditivos: no se requieren para suero. Para las muestras de plasma se puede emplear heparina, citrato o EDTA como anticoagulante.

c) Sustancias Interferentes conocidas: no se observan interferencias por bilirrubina hasta 30 mg/dl, ácido ascórbico hasta 50 mg/dl, triglicéridos hasta 1500 mg/dl o hemoglobina hasta 270 mg/dl. Muestras conteniendo partículas deberán clarificarse mediante centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra se debe conservar refrigerada (2-10°C). En caso de no realizar el análisis dentro de las 72 horas se debe congelar a -20°C. No se recomienda realizar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento. Esto puede generar resultados erróneos. En caso de utilizar muestras congeladas, éstas deben ser homogeneizadas y centrifugadas

antes de su uso.

La inactivación por calor puede afectar el resultado.

No utilizar muestras con contaminación microbiana.

Si las muestras deben ser transportadas, embalarlas de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de material infeccioso.

PROCEDIMIENTO

1- Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba.

2- Preparar el volumen necesario de buffer de lavado diluido.

3- Colocar en el soporte de tiras, el número de pocillos requeridos para la cantidad de determinaciones a realizar, incluyendo 2 pocillos para el Control Positivo (CP) y 3 para el Control Negativo (CN).

4- Dispensar la Muestra (M) y los controles según el siguiente esquema:

	M	CP	CN
Control Positivo	-	50 ul	-
Control Negativo	-	-	50 ul
Muestra	50 ul	-	-

5- Para evitar la evaporación, cubrir la placa con la cinta autoadhesiva provista, e incubar 30 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C.

6- Después de la incubación eliminar el líquido de cada pocillo por completo. Lavar 5 veces según instrucción de lavado (ver Procedimiento de Lavado).

7- Agregar el Conjugado:

	M	CP	CN
Conjugado	100 ul	100 ul	100 ul

8- Para evitar la evaporación cubrir la policubeta con cinta autoadhesiva. Incubar 30 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C.

9- Lavar 5 veces según instrucción de lavado.

10- Dispensar el Revelador trasvasando a un recipiente limpio solamente el volumen necesario. No devolver el Revelador restante al frasco original. Evitar el contacto del reactivo con agentes oxidantes.

	M	CP	CN
Revelador	100 ul	100 ul	100 ul

11- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), protegido de la luz.

12- Agregar el Stopper:

	M	CP	CN
Stopper	100 ul	100 ul	100 ul

13- Leer absorbancia en espectrofotómetro en forma bicromática a 450/620-650 nm o a 450 nm.

Nota: se recomienda realizar siempre la lectura en forma bicromática. En caso de que la lectura sea monocromática, realizar un blanco de reactivos que luego deberá ser restado de todos los valores de las muestras.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 10 minutos, por lo

que los resultados deben leerse dentro de ese lapso.

PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Eliminar el líquido de los pocillos por aspirado o volcado. Los pocillos se lavan con 350 ul de buffer de lavado diluido. Asegurar que la altura alcanzada al llenar los pocillos no cause desbordes. La solución de lavado debe estar en contacto con los pocillos entre 30 y 60 segundos.

Garantizar que luego del último lavado no quede líquido residual. Realice un doble aspirado para eliminar el excedente de buffer. Si persiste luego de este procedimiento, invertir la

placa sobre papel absorbente y golpearla varias veces, de lo contrario podrán obtenerse resultados erróneos.

Nota: el procedimiento de lavado es crítico para el resultado del ensayo. Si queda buffer de lavado en el pocillo o si los pocillos no están completamente llenos se obtendrán resultados erróneos. No dejar que los pocillos se sequen durante el procedimiento. Los lavadores automáticos deben ser enjuagados con agua destilada o desionizada al final del día para evitar obstrucciones debido a las sales presentes en el buffer de lavado.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

ETAPA	PROCEDIMIENTO	PRECAUCIONES/OBSERVACIONES
Dilución	Preparación de la solución de lavado (1x)	Disolución de los cristales de sales
Muestras	Agregar 50 ul de M, CP e CN	
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	En estufa
Lavado	Lavar cada pocillo con 350 ul de buffer de lavado (5 veces)	Tiempo de contacto de la solución de lavado de 30 e 60 segundos. Eliminar completamente el líquido residual de los pocillos
Conjugado	Agregar 100 ul de Conjugado	
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	En estufa
Lavado	Idem al lavado anterior	
Revelado	Agregar 100 ul de Revelador	Trasvasar el volumen necesario de Revelador a usar. No pipetear del frasco original. Descartar el reactivo remanente. Evitar el contacto con agentes oxidantes.
Incubación	Durante 30 ± 2 minutos entre $18-25^\circ\text{C}$	Mantener la policubeta protegida de la luz
Detención	Agregar 100 ul de Stopper	
Lectura	Leer en espectrofotómetro	Leer dentro de los 10 minutos

CRITERIOS DE VALIDACION DEL ENSAYO

El ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

1. El promedio de las densidades ópticas (D.O.) de los Controles Negativos deben ser $\leq 0,050$.

Ejemplo:

Lectura 1 = 0,015, Lectura 2 = 0,018, Lectura 3 = 0,021
 Promedio = $(0,015+0,018+0,021) / 3 = 0,018$

2. Eliminar cualquier Control Negativo con D.O. $> 0,050$.

3. Si se ha eliminado algún Control Negativo, volver a calcular el promedio de los Controles Negativos. Un ensayo es válido si se aceptan al menos dos de los Controles Negativos.

4. El promedio de las D.O. de los Controles Positivos debe ser $\geq 1,200$.

Ejemplo:

Lectura 1 = 1,658, Lectura 2 = 1,721
 Promedio = $(1,658+1,721) / 2 = 1,689$

5. La diferencia entre el promedio de las D.O. de los Controles Positivos y Controles Negativos debe ser $\geq 1,100$.

Si una de estas condiciones no se cumple, repetir el ensayo. Recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

a) Con instrumental óptico:

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-HIV-1 o HIV-2 se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del Cut-off.

Cut-off = CN + 0,250

CN: promedio de las D.O. del Control Negativo

Ejemplo: $0,018 + 0,250 = 0,268$

Muestras No Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias menores al Cut-off

Muestras Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias mayores o iguales al Cut-off.

b) Interpretación visual:

Si se opta por este tipo de interpretación, debe considerarse No Reactiva toda muestra que no presente una coloración

mayor que la de los Controles Negativos. Por el contrario, una muestra netamente amarilla se considera Reactiva.

Toda muestra inicialmente reactiva debe ser repetida por duplicado. Si una o ambas repeticiones dan positivas, la misma debe considerarse reactiva.

Una muestra inicialmente reactiva puede ser no reactiva en las dos repeticiones. Esto puede deberse a:

- Contaminación cruzada de un pocillo no reactivo por una muestra reactiva.
- Contaminación de la muestra durante la dispensación, imprecisión en el dispensado de muestra, conjugado y/o Revelador en el pocillo
- Reutilización de tips.
- Contaminación del pocillo con hipoclorito u otros agentes oxidantes.

En ciertos casos una muestra no reactiva puede presentar una reacción falsamente reactiva, tanto en el análisis inicial como en sus repeticiones. Algunas causas de este fenómeno pueden ser:

- Contaminación de la muestra durante la extracción, procesamiento o conservación.
- Presencia de sustancias interferentes, tales como autoanticuerpos, fármacos, etc.
- Dispensación y/o aspirado ineficiente de la solución de lavado (sistema obstruido).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias Interferentes conocidas en Muestra.
- No se debe utilizar pool de muestras.
- No se deben utilizar otros fluidos corporales como la saliva, líquido cefalorraquídeo u orina.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por HIV-1 o HIV-2. Los resultados repetidamente reactivos deben corroborarse por un método confirmatorio, de acuerdo a la normativa legal vigente.
- No utilizar muestras inactivadas por calor ya que pueden ocasionar resultados falsos positivos.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

Sensibilidad clínica

a) *Sensibilidad clínica con paneles de seroconversión (BBI, Boston Biomedica Inc)*

Nombre del panel	Días desde la recolección de la muestra	Tiempo (días) en que la muestra se torna reactiva		
		HIV 1+2 ELISA 3ª Gen.	ELISA HIV 3ª Gen. (BBI)	W. Blot (BBI)
PRB 904-D	0, 21, 49, 92, 99	92	92	92
PRB 912-L	0, 9, 14, 16, 28, 30	0	0	9
PRB 916-P	0, 4, 9, 18, 30, 35	30	30	30
PRB 919-S	0, 9, 11	9	9	9
PRB 924-X	0, 2, 8, 10, 26, 33, 35, 40	33	33	35 (Indet)
PRB 925-Y	0, 10, 18, 22, 44, 49	44	44	44 (Indet)
PRB 930-AE	0, 3, 7, 10	7	7	10 (Indet)

PRB 934 AI	0, 7, 11	7	7	ND
PRB 944-AT	0, 2, 7, 9, 14, 16	14	14	14 (Indet)
PRB 945 AU	0, 3, 13, 15, 20	15	13	20
PRB 947-AW	0, 9, 11, 20	9	9	20
PRB 949-AY	0, 6, 9, 18, 20	20	20	20 (Indet)
PRB 951-BE	0, 2, 8, 11, 15, 19	19	19	No reactivo
PRB 952-BB	0, 7, 10, 14, 17, 21	17	14	17
PRB 953-BC	0, 3, 7, 10	10	7	No reactivo
PRB 966	0, 2, 20, 22, 30, 35, 37, 44, 48, 51	48	48	No reactivo

Indet: indeterminadas

b) *Sensibilidad clínica en Paneles de Performance*

En un estudio realizado sobre diferentes paneles comerciales internacionales, se obtuvieron los siguientes resultados:

-PRZ 207 (Anti-HIV-1/2 Combo Performance Panel): se detectaron 14 de las 14 muestras reactivas.

-PRZ 206 (Anti-HIV-1/2 Combo Performance Panel) se detectan 11 de las 12 muestras reactivas.

c) *Sensibilidad en paneles de muestras reactivas anti-HIV*

En un estudio realizado sobre 123 muestras de pacientes con infección por HIV-1 confirmados por diferentes métodos, se encontraron reactivas la totalidad de las muestras con el kit HIV 1+2 ELISA 3ª Generación.

b) *Especificidad*

En un estudio realizado sobre 3004 muestras de sueros y plasmas de cinco centros de salud diferentes, se encontraron 33 muestras reactivas de las cuales 28 fueron confirmadas por otros métodos, obteniéndose una especificidad del 99,83%

Se estudio la posible aparición de reactividad cruzada en 272 muestras provenientes de individuos con diferentes condiciones clínicas que podrían ser causantes de reacciones inespecíficas en el ensayo HIV 1+2 ELISA 3ª Generación.

Este grupo incluye muestras:

- con anticuerpos contra HAV, HBV, EBV, CMV, HSV, VZV, HCV, HTLV y otros virus
- con anticuerpos contra *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Trypanosoma cruzi* y otros microorganismos.
- con diferentes autoanticuerpos (AGA, AMA, ATA, FAN, factor reumatoideo y otros)

La especificidad en esta población fue de 97,42%.

En otro estudio sobre 91 plasmas de mujeres embarazadas se observó una especificidad del 98,9%.

c) *Precisión*

Se evaluó la precisión del test siguiendo el protocolo EP5A recomendado por la NCCLS. Los ensayos fueron realizados con muestras de diferentes niveles de reactividad y con los controles. Se realizaron 2 ensayos diarios evaluando cada muestra por duplicado por el transcurso de 20 días.

Muestra	Media (D.O.)	Intra-ensayo		Inter-ensayo	
		D.S.	C.V.	D.S.	C.V.
M1	0,354	0,026	7,34%	0,037	10,45%
M2	0,790	0,073	9,24%	0,107	13,54%
C (+)	1,273	0,056	4,40%	0,096	7,54%
C (-)	0,014	0,002	15,22%	0,003	23,19%

n= 80

PRESENTACION

- 96 determinaciones (Cód. 1723096)
- 192 determinaciones (Cód. 1723192)

BIBLIOGRAFIA

- Gallo, RC - Retrovirology 3:72, 2006.
- Fauci, AS - Nature Medicine 9/7:839-843, 2003.
- Fiebig, EW et al. - AIDS 17 /13:1871-1879, 2003.
- WHO - HIV Testing, Treatment and Prevention. Generic tools for operational research, 2009.
- WHO - AIDS Epidemic update, 2009.
- Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A 19/2 (1999) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Specifications for Immunological Testing for Infectious Diseases. Approved Guideline I/LA18-A2 (1994) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline I/LA21-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline EP7-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

Buf. Lavado **Conc.**

Buffer de Lavado Concentrado

Conjugado

Conjugado

Control **+**

Control Positivo

Revelador

Revelador

Control **-**

Control Negativo

Stopper

Stopper

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

IVD 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

Cont. Contenido

LOT Número de lote

Elaborado por:

Nocivo

Corrosivo / Cáustico

Irritante

Consultar instrucciones de uso

Calibr. Calibrador

CONTROL Control

CONTROL **+** Control Positivo

CONTROL **-** Control Negativo

REF 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° 6696/11



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina