



DIA (Dot Immuno Assay)*

HIV 1+2

Imunoensaio sobre suporte sólido para a detecção de anticorpos contra os vírus da imunodeficiência humana HIV-1, HIV-1 grupo O e HIV-2)

SIGNIFICADO CLÍNICO

Os vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2) causantes do AIDS, são transmitidos principalmente por contato sexual ou através do sangue ou produtos contaminados derivados do sangue.

Em indivíduos infectados com estes vírus aparecem anticorpos, como resposta do sistema imunitário à invasão viral. Estes anticorpos não são protetores e não conferem imunidade, mas por serem marcadores do início da infecção, sua detecção constitui atualmente a base do estudo da patologia da doença.

Este kit foi desenvolvido para detectar conjuntamente a presença dos anticorpos anti-HIV-1, anti-HIV-1 grupo O e anti-HIV-2.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A amostra diluída entra em contato com o suporte sólido em forma de pente no qual se encontram imobilizados peptídeos sintéticos de transmembrana de HIV-1 e HIV-2. Se a amostra contiver anticorpos anti-HIV-1, anti-HIV-1 grupo O e HIV-2 vai-se formar um imunocomplexo que ficara unido ao suporte. Após o lavado, incuba-se o pente com o conjugado de proteína A-ouro coloidal (Revelador). A proteína A se une ao fragmento Fc dos anticorpos. O aparecimento de uma mancha roxa no lugar onde se encontram fixados os peptídeos sintéticos é indicativo de que se formou o imunocomplexo e portanto da presença na amostra de anticorpos anti-HIV-1, anti-HIV-1 grupo O ou HIV-2.

REAGENTES FORNECIDOS

Antígeno: suporte sólido em forma de pente, contendo imobilizados em cada "dente", peptídeos sintéticos de antígenos de transmembrana de HIV-1 e HIV-2 (parte opaca do pente).

Diluyente de Amostras: solução fisiológica com tensoativo não-iônico, pH 7,3.

Tampão de Lavagem concentrado: cloreto de sódio 1,4 mol/l em tampão fosfatos 100 mmol/l e tensoativo não iônico 0,1 g/l.

Revelador: proteína A de *Staphylococcus aureus* conjugada com ouro coloidal.

Controle Positivo: diluição de soro inativo, reativo para anticorpos anti-HIV.

Controle Negativo: diluição de soro inativo, não reativo.

INSTRUÇÕES PARA USO

Antígeno: pronto para uso. Ao cortar o envelope tenha o cuidado de não cortar com a tesoura os pentes ou o envelope com dessecante.

Diluyente de Amostras: pronto para uso.

Tampão de Lavagem: em temperaturas baixas, os componentes do reagente podem precipitar. Neste caso colocar em banho-maria a 37°C alguns minutos e misturar por inversão. Diluir 1+7 com água destilada (1 parte de Tampão de Lavagem concentrado + 7 partes de água destilada). Tenha em conta que ao realizar a técnica o Tampão de Lavagem é preparado de uma só vez e é utilizado nas duas lavagens. Após, a solução deve ser descartada com a adição prévia de 5 ml de hipoclorito de sódio a 5 %.

Revelador: pronto para uso.

Controle Positivo: pronto para uso.

Controle Negativo: pronto para uso.

PRECAUÇÕES

- Todas as amostras dos pacientes devem-se manipular como se fossem capazes de transmitir infecção. Os controles encontram-se inativos. No entanto, devem-se utilizar como se tratando de material infectante.
- Os soros controles foram testados contra HBsAg e considerados negativos.
- Todos os materiais empregados no ensaio devem ser destruídos a fim de assegurar a inativação de agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é a auto-clavação durante uma hora a 121°C. Os líquidos de descarte devem ser tratados com hipoclorito de sódio (concentração final de 5%) durante pelo menos 60 minutos.
- Se não foram utilizadas todas as cubetas da microplaca, descartar o líquido das mesmas em um recipiente para dejetos biológicos que contenha 5% de hipoclorito de sódio. Após, bater a microplaca varias vezes sobre papel absorvente que será descartado como dejeito biológico e lavá-la com uma solução alcoólica ao 50%. Secar e cobrir as cubetas utilizadas com fita adesiva, para evitar sua utilização.
- Não intercambiar reagentes de kits e lotes diferentes.
- Não empregar reativos de outra origem.
- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- O Tampão de Lavagem contém azida sódica.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os Reagentes Fornecidos são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

Tampão de Lavagem: preparar no momento de uso.

Antígeno: os pentes com antígeno imobilizado são fornecidos fechados e com dessecante. Para evitar umidade, o envelope só deve ser aberto no momento de uso e quando estiver a temperatura ambiente. Os pentes não utilizados

devem ser conservados no envelope com dessecante, fechado com fita adesiva e refrigerados a 2-10°C. Os pentes conservados nestas condições podem ser utilizados dentro dos 2 meses subseqüentes, contanto que não se supere a data de vencimento do kit.

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta: obter a amostra da maneira usual.

b) Aditivos: o plasma pode ser obtido utilizando qualquer anticoagulante de uso corrente na prática transfusional.

c) Substâncias interferentes conhecidas: a hemólise pode causar resultados errôneos.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: as amostras não diluídas conservam-se no máximo por 4 horas a temperatura ambiente e até 7 dias refrigeradas (2-10°C). Para conservação por período mais prolongado, as amostras devem ser congeladas a -20°C ou menos. Os congelamentos e descongelamentos repetidos podem fornecer falsos resultados.

Se houver necessidade de transportar as amostras, devem-se embalar segundo as especificações legais relativas ao envio de materiais infecciosos.

MATERIAL NECESSÁRIO

1- Fornecido

- microplacas
- recipiente para lavagem

2- Não fornecido

- micropipeta de 100 ul
- relógio alarme ou cronômetro
- material volumétrico adequado

CONDIÇÕES DA REAÇÃO

- Tempo total da reação: 20 minutos
- Temperatura da reação: temperatura ambiente (> 22°C). Se a temperatura for menor a 22°C, realizar a reação em estufa a 37°C.
- Volume da amostra: 100 ul

PROCEDIMENTO

Antes de iniciar a prova, os reagentes e as amostras deverão estar a temperatura ambiente. Uma vez iniciada, a análise deve ser completada sem interrupção.

Processar simultaneamente 1 Controle Positivo (no "dente" da extrema direita do pente) e 1 Controle Negativo (no "dente" da extrema esquerda do pente). A seguir, proceda da seguinte forma:

Preparo do material:

Colocar 2 gotas de Diluente de Amostra em cada cubeta a ser utilizada da microplaca. Em cada microcubeta a ser utilizada, colocar 100 ul de Amostra ou Controles. Colocar com precaução, os mesmos no fundo das cubetas para se assegurar de não respingar às cubetas vizinhas. Misturar aspirando com a micropipeta várias vezes o conteúdo de

cada microcubeta a fim de assegurar uma homogeneização correta. Na fileira de cubetas contígua à utilizada para as amostras, colocar 3 gotas de Revelador por microcubeta a utilizar. Preparar o Tampão de Lavagem como foi explicado anteriormente em INSTRUÇÕES PARA USO. Colocar o Tampão de Lavagem no recipiente adequado, tendo a precaução de não formar espuma. Este recipiente deverá permitir que os dentes do pente fiquem totalmente submergidos.

Realização da prova:

Abrir cuidadosamente o envelope e extrair o número de pentes necessários para o ensaio. Conservar os restantes como foi indicado em ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO. Colocar a identificação de cada amostra diretamente na parte superior do dente correspondente.

Importante: não tocar em nenhum momento nas áreas reativas do pente, já que isto pode ocasionar resultados errados.

Colocar o pente nas cubetas da microplaca que contém as diluições das amostras e controles e incubar durante exatamente 10 minutos a temperatura ambiente.

Retirar o pente das cubetas e escorrer as pontas dos dentes tocando sobre papel absorvente. Não tocar o papel com a área reativa dos dentes. Mantendo o pente na posição vertical com os dentes para baixo e a zona reativa de frente para o operador, submergir o pente no Tampão de Lavagem. Lavar 10 vezes repetindo um movimento do pente constante, lento e suave, para a frente e para trás sem tocar as paredes do recipiente. Escorrer novamente as pontas dos dentes como explicado anteriormente.

Colocar o pente nas cubetas que contém o Revelador e incubar a temperatura ambiente durante exatamente 10 minutos. Ter em conta que a reação positiva se intensifica se houver agitação durante a revelação, por exemplo num agitador de Kline.

Ao finalizar a incubação repetir a lavagem como se indicou mais acima, empregando o mesmo tampão de lavagem usado anteriormente.

Colocar o pente sobre uma superfície limpa com a zona reativa para cima e deixar secar completamente antes de observar os resultados.

A cor do "dot" se intensifica ao secar. Efetuar a leitura dos resultados sob luz natural ou fluorescente. Não utilizar lâmpada incandescente.

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor da reação é estável indefinidamente, portanto o suporte pode ser utilizado para futuras referências de resultados.

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

O ensaio é considerado válido se cumpridos simultaneamente as seguintes condições:

- Não deverá aparecer cor detectável no dente correspondente ao Controle Negativo.
- O Controle Positivo deverá ser nitidamente detectável.

Se alguma destas condições não for cumprida o ensaio deverá ser repetido.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Ver Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

- O kit foi desenhado para usar com amostras puras. Não utilizar amostras diluídas já que as mesmas podem ocasionar resultados falsos negativos.
- Considerar que a presença de anticorpos anti-HIV no soro **NÃO** é diagnóstico de AIDS. Os resultados repetidamente reativos devem ser comprovados por métodos de referência como o Western blot.
- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição a infecção pelo HIV.
- Podem-se obter resultados falsos positivos nas seguintes situações: doenças autoimunes, tuberculose, lúpus eritematoso sistêmico, gravidez, vacinação contra a hepatite B e outras imunizações, hemodiálise, doença hepática e outras doenças.

DESEMPENHO

- Num estudo conduzido pelo Global Program on AIDS (GPA) pertencente à World Health Organization (WHO) foi avaliado um painel de 600 soros humano e 8 painéis de soroconversão. Os dados obtidos foram comparados com o Western blot como método de referência, encontrando-se uma sensibilidade de 100%, uma especificidade de 99,7%, e uma reprodutibilidade de 99,4%.
- Num estudo realizado com 425 amostras provenientes de pacientes do Instituto de Infectologia Emilio Ribas de São Paulo, obteve-se uma sensibilidade de 99,5%, uma especificidade de 96,4% e uma eficiência de 97,8%.
- Num estudo realizado com duas amostras de HIV-1 grupo O, B7-2705-0001 e JP8-2707-0001, da Boston Biomedica Inc., foram detectadas as duas amostras.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Uma vez finalizada a prova e após o pente haver secado completamente, observar os resultados sobre uma superfície branca, a olho nu e com boa iluminação.

Amostra Reativa: presença de uma mancha colorida (fracamente rósea a roxa) na zona reativa do pente. Sempre que presente, ainda que a cor seja de menor intensidade que o Controle Positivo, é considerada como reativa.

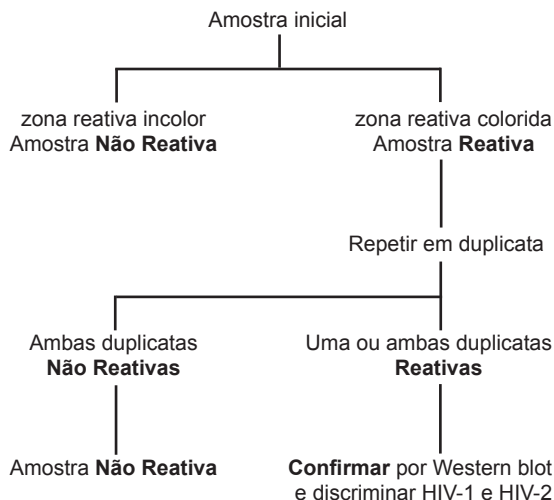
Amostra Não Reativa: não se observa coloração na zona reativa do pente.

Toda prova inicialmente reativa deve ser ensaiada novamente em duplicata. Se uma ou ambas as duplicatas são reativas, se supõe que a amostra contém anticorpos anti-HIV-1 ou anti-HIV-2.

Se ambas as duplicatas forem não reativas, considera-se o primeiro resultado como falsamente positivo, presumindo-se que a amostra não contenha anticorpos anti-HIV-1, nem anti-HIV-2.

Toda amostra Reativa deve ser ensaiada novamente empregando um método de referência e realizando a discriminação entre HIV-1 e HIV-2.

ESQUEMA DE INTERPRETAÇÃO



APRESENTAÇÃO

Kit para 48 testes (Cód. 1723201).

REFERÊNCIA

- 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. - VIIth 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. - 46th 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/RR:19:59 (2001).

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Antígeno	Diluyente	Muestra
Antígeno	Diluyente de Amostras	
Revelador	Buf. Lavado	Conc.
Revelador	Tampão de Lavagem concentrado	
Control +	Control -	
Controle Positivo	Controle Negativo	

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

EC | REP Representante autorizado na Comunidade Europeia

IVD Uso médico-diagnóstico "in vitro"

Conteúdo suficiente para <n> testes

Data de validade

Limite de temperatura (conservar a)

Não congelar

Risco biológico

Volume após da reconstituição

Cont. Conteúdo

LOT Número de lote

Elaborado por:

Nocivo

Corrosivo / Caústico

Irritante

Consultar as instruções de uso

Calibr. Calibrador

CONTROL Controle

CONTROL+ Controle Positivo

CONTROL- Controle Negativo

REF Número de catálogo

Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina