



# HIV 1+2

## ELISA 3ª Generación

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 em soro ou plasma

### SIGNIFICADO CLÍNICO

Os vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2) são os agentes causadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Estes retrovírus são transmitidos pela exposição a certos fluidos corporais infectados, principalmente secreções genitais e sangue ou produtos contaminados derivados do sangue e por passagem através da placenta. A evidência sorológica da infecção por HIV-1 e HIV-2 pode ser obtida determinando a presença de antígenos e anticorpos no soro de indivíduos nos quais é suspeita infecção. Os antígenos podem, geralmente, ser detectados na fase aguda e durante a fase sintomática da enfermidade. Os anticorpos podem ser detectados ao longo de toda a infecção, começando na fase aguda ou imediatamente depois dela. O ensaio de **HIV 1+2 ELISA 3ª Generación** foi desenvolvido para detectar anticorpos contra HIV-1, HIV-1 grupo O e HIV-2.

### FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Os poços da policubeta estão recobertas com antígenos recombinantes dos vírus HIV-1 e HIV-2. A amostra é incubada nos poços, se ela contém anticorpos contra HIV-1 ou HIV-2 ocorrerá a união com os antígenos sensibilizados na policubeta. O material não unido deve ser removido por lavagem. No passo seguinte é adicionado o conjugado, que contém os mesmos antígenos do que a policubeta, conjugados com peroxidase. Se a amostra contém os anticorpos, será unido o conjugado. O conjugado não unido é removido por lavagem. A seguir é adicionada uma solução contendo tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. As amostras reativas desenvolverão cor azul claro que se torna amarela quando a reação é parada com ácido sulfúrico.

### REAGENTES FORNECIDOS

**Policubeta sensibilizada:** policubeta de tiras removíveis com 96 poços recobertos com antígenos recombinantes de HIV-1 e HIV-2.

**Conjugado:** antígenos recombinantes unidos a peroxidase. Cor vermelho.

**Revelador:** solução de tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio.

**Stopper:** ácido sulfúrico 2 N.

**Tampão de Lavagem Concentrado:** tampão salino com tensoativo, (25x). Cor verde.

**Controle Positivo:** soro humano inativado, contendo anticorpos anti-HIV-1 e HIV-2. Cor laranja.

**Controle Negativo:** soro humano não reativo, inativado. Cor amarelo.

### REAGENTES NÃO FORNECIDOS

Água destilada ou desionizada.

### MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipetas para medir os volumes indicados
- Ponteiras descartáveis
- Material volumétrico para preparar as diluições indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorvente
- Luvas descartáveis
- Relógio alarma ou cronômetro
- Hipoclorito de sódio
- Sistema de lavagem de policubetas ( manual ou automático)
- Espectrofotômetro para leitura de policubetas

### PRECAUÇÕES

- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas como se fossem capazes de transmitir infecção.
- Os soros controles foram testados para antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg) e anticorpos contra o vírus da hepatite C (HCV) encontrando-se inativos. Entretanto, recomenda-se manipular com as precauções requeridas para amostras potencialmente infecciosas.
- Todos os materiais utilizados para o ensaio devem ser tratados a fim de assegurar a inativação de agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é autoclavar durante 1 hora a 121°C. Os líquidos de dejetos podem ser desinfetados com hipoclorito de sódio (concentração final 5%) durante pelo menos 60 minutos.
- Não trocar reagentes de kits e lotes distintos.
- Não usar reagentes de outra origem.
- Evitar tocar as paredes dos poços com as ponteiras.
- Não utilizar componentes metálicos que possam entrar em contato com os reagentes.
- As policubetas devem ser incubadas em estufa. Deve-se evitar abrir a estufa durante a incubação. Não usar banho-maria.
- Evitar que os vapores de hipoclorito provenientes dos recipientes para dejetos biológicos ou outras fontes entrem em contato com os reagentes pois o hipoclorito afeta a reação.
- Evitar o contato do ácido sulfúrico (Stopper) com a pele e mucosas. H315+H320: Provoca irritação cutânea e ocular. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P262: Não pode entrar em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280: Usar luvas de protecção/

vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

- Evitar o derramamento de líquidos ou formação de aerossóis.
- Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis e proteção para os olhos durante a manipulação das amostras e reagentes do ensaio.
- Todos os reagentes e as amostras devem-se descartar conforme à regulação local vigente.

### PREPARAÇÃO DOS REATIVOS

É importante que todo material utilizado para a preparação dos reagentes esteja limpo e livre de detergente e hipoclorito.

**Tampão de Lavagem:** em baixa temperatura os componentes do reagente podem precipitar. Neste caso, aquecer a solução à 37°C até sua dissolução total. Para a obtenção do tampão de lavagem pronto para usar, diluir uma parte do tampão de lavagem concentrado (25x) com 24 partes de água destilada ou desionizada. Ex: 20 ml em 480 ml para uma policubeta.

**Policubeta sensibilizada, Conjugado, Revelador, Stopper, Controle Positivo e Controle Negativo:** prontos para o uso.

### ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

**Reagentes Fornecidos:** estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

**Tampão de Lavagem concentrado e Stopper:** podem ser conservados à 2-25°C.

**Tampão de Lavagem (1x):** uma vez diluído é estável por até 3 meses em temperatura ambiente (2-25°C).

**Policubeta Sensibilizada:** não abrir a embalagem até o momento, e esperar atingir a temperatura ambiente, pois do contrário favorecerá a formação de condensação de água na superfície dos poços. As tiras de poços não utilizadas devem ser conservadas entre 2-10°C dentro do envelope aluminizado com o dessecante perfeitamente fechado.

As tiras conservadas nestas condições são estáveis por 4 meses, desde que não ultrapasse a data de vencimento indicada na embalagem.

### AMOSTRA

Soro ou plasma

**a) Coleta:** obter a amostra de maneira usual.

**b) Aditivos:** não são necessários. Para as amostras de plasma pode ser utilizado heparina, citrato ou EDTA como anticoagulantes.

**c) Substâncias interferentes conhecidas:** não se observam interferências por bilirrubina até 30 mg/dl, ácido ascórbico até 50 mg/dl, triglicerídeos até 1500 mg/dl ou hemoglobina até 270 mg/dl. Amostras contendo partículas devem ser clarificadas mediante centrifugação.

**d) Estabilidade e instruções de armazenamento e transporte:** a amostra deve ser conservada sob refrigeração (2-10°C). Em caso de não realizar a análise dentro de 72 horas deve ser congelada a -20°C. Não é recomendável realizar múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento. Isto pode gerar resultados errôneos. Caso serem utilizadas amostras congeladas, devem ser homogeneizadas e cen-

trifugadas antes de seu uso.

A inativação por calor pode alterar o resultado.

Não utilizar amostras com contaminação microbiana.

Caso as amostras necessitem ser transportadas, embalar de acordo com as especificações legais relativas ao envio de material infectante.

### PROCEDIMENTO

**1-** Levantar os reagentes e amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova.

**2-** Preparar o volume necessário de Tampão de Lavagem diluído.

**3-** Colocar no suporte de tiras, a quantidade de poços requeridos para a quantidade de determinações a serem realizadas, incluindo 2 poços para o Controle Positivo (CP) e 3 para o Controle Negativo (NC).

**4-** Colocar a Amostra (A) e os controles de acordo com o seguinte esquema:

	A	CP	CN
<b>Controle Positivo</b>	-	50 ul	-
<b>Controle Negativo</b>	-	-	50 ul
<b>Amostra</b>	50 ul	-	-

**5-** Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com fita adesiva fornecida e incubar durante 30 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C.

**6-** Depois da incubação, eliminar o líquido de cada poço por completo, lavar 5 vezes segundo as instruções de lavagem (VIDE PROCEDIMENTO DE LAVAGEM)

**7-** Acrescentar o Conjugado:

<b>Conjugado</b>	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

**8-** Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com fita adesiva. Incubar durante 30 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C.

**9-** Lavar 5 vezes segundo as instruções de lavagem.

**10-** Colocar o Revelador transvasando a um recipiente limpo somente o volume necessário. Não voltar o Revelador remanescente ao frasco original. Evitar o contato do reagente com agentes oxidantes.

<b>Revelador</b>	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

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

**12-** Acrescentar o Stopper:

<b>Stopper</b>	100 ul	100 ul	100 ul
----------------	--------	--------	--------

**13-** Ler a absorbância em espectrofotômetro em forma bicromática a 450/600-650 nm ou a 450 nm.

Nota: recomenda-se realizar sempre a leitura em forma bicromática. Caso a leitura for monocromática, realizar um branco de reagentes que deverá ser subtraído das leituras das amostras.

### ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor da reação é estável durante 10 minutos, portanto os resultados devem ser observados dentro deste período.

## PROCEDIMENTO DE LAVAGEM

Eliminar o líquido dos poços por aspirado ou despejado. Os poços são lavados com 350 ul de Tampão de Lavagem diluído. Assegurar que a altura alcançada ao encher os poços não desborde. A solução de lavagem deve ficar em contato com os poços entre 30 e 60 segundos. Garantir que após a última lavagem não fique líquido residual. Realize uma dobre aspiração para eliminar o excedente de tampão. Caso ficar líquido depois deste procedimento, inverter a policubeta sobre um papel absorvente e golpeá-la

varias vezes. Caso contrário podem ser obtidos resultados errôneos.

**Nota:** o procedimento de lavagem é crítico para o resultado do ensaio. Caso ficar tampão de lavagem no poço ou os poços não estiverem completamente cheios podem ser obtidos resultados errôneos. Não deixar que os poços sequem durante o procedimento. Os lavadores automáticos devem ser enxaguados com água destilada ou desionizada ao final do dia para evitar obstruções devido aos sais presentes no tampão de lavagem.

## RESUMO DO PROCEDIMENTO

ESTÁGIO	PROCEDIMENTO	PRECAUÇÕES/OBSERVAÇÕES
Diluição	Preparação da solução de lavagem (1x)	Dissolução dos cristais de sais
Amostras	Acrescentar 50 ul de A, CP e CN	
Incubação	Cobrir os poços e incubar durante $30 \pm 2$ minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	Em estufa
Lavagem	Lavar cada poço com 350 ul de tampão de lavagem (5 vezes)	Tempo de contato da solução de lavagem entre 30 e 60 segundos. Eliminar completamente o líquido residual dos poços
Conjugado	Acrescentar 100 ul de Conjugado	
Incubação	Cobrir os poços e incubar durante $30 \pm 2$ minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	Em estufa
Lavagem	Idem à lavagem anterior	
Revelado	Acrescentar 100 ul de Revelador	Transvasar o volume necessário de Revelador a usar. Não pipetar do frasco original. Descartar o reagente remanescente. Evitar o contato com agentes oxidantes.
Incubação	Durante $30 \pm 2$ minutos entre $18-25^\circ\text{C}$	Manter a policubeta ao abrigo da luz
Detenção	Acrescentar 100 ul de Stopper	
Leitura	Ler em espectrofotômetro	Ler dentro dos 10 minutos

## CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DO ENSAIO

A prova é considerada válida se cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

1. O promédio das densidades ópticas (D.O.) dos Controles Negativos devem ser  $\leq 0,050$ .

Exemplo:

Leitura 1 = 0,015, Leitura 2 = 0,018, Leitura 3 = 0,021  
Promédio =  $(0,015 + 0,018 + 0,021) / 3 = 0,018$

2. Eliminar qualquer Controle Negativo com D.O.  $> 0,050$

3. Caso fosse eliminado algum Controle Negativo, voltar a calcular o promédio dos Controles Negativos. Um ensaio é válido se fossem aceitos pelo menos dois dos Controles Negativos.

4. O promédio das D.O. dos Controles Positivos deve ser  $\geq 1,200$ .

Exemplo:

Leitura 1 = 1,658, Leitura 2 = 1,721  
Promédio =  $(1,658 + 1,721) / 2 = 1,689$

5. A diferença entre o promédio das D.O. dos Controles Positivos e Controles Negativos deve ser  $\geq 1,100$

Se uma de estas condições não se cumprirem, repetir a prova. Lembrar que as leituras obtidas dependem da sensibilidade do aparelho utilizado.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### a) Com instrumental óptico

A presença ou ausência de anticorpos anti-HIV-1 ou HIV-2 é determinada relacionando a absorbância da amostra com o valor do Cut-off.

Cut-off =  $\text{CN} + 0,250$

CN: promédio das D.O. do Controle Negativo

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

**Amostras Não Reativas:** são consideradas aquelas com absorbâncias menores ao valor Cut-off

**Amostras Reativas:** são consideradas aquelas com absorbâncias maiores ou iguais ao valor Cut-off.

## b) Interpretação visual

Se é escolhido este tipo de interpretação, deve ser considerada Não Reativa toda amostra que não apresente uma cor maior do que aquela dos Controles Negativos. Pelo contrário, uma amostra nitidamente amarela é considerada Reativa.

Toda amostra inicialmente reativa, deve ser repetida por duplicado. Se uma ou ambas repetições fossem positivas, a amostra deve ser considerada reativa.

Uma amostra inicialmente reativa pode ser não reativa nas duas repetições. Isto pode ser devido à:

- Contaminação cruzada de um poço não reativo por uma amostra reativa.
- Contaminação da amostra durante a dispensação, imprecisão no dispensado da amostra, Conjugado e/ou Revelador no poço.
- Reutilização de ponteiros.
- Contaminação do poço com hipoclorito ou outros agentes oxidantes.

Em certos casos, uma amostra não reativa pode apresentar uma reação falsamente reativa, tanto na análise inicial como em suas repetições. Algumas causas destes fenômenos podem ser:

- Contaminação de uma amostra durante sua extração, processamento ou conservação.
- Presença de substâncias interferentes, tais como auto-anticorpos, fármacos, etc.
- Dispensação e / ou aspiração ineficiente da solução de lavagem (sistema obstruído).

## LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

- Não se deve utilizar pool de amostras
- Não se deve utilizar outros fluidos corporais como a saliva, líquido cefalorraquidiano ou urina.
- Um resultado não reativo não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por HIV-1 ou HIV-2. Os resultados repetidamente reativos devem ser conferidos por um método confirmatório, segundo a normativa legal vigente.
- Não utilizar amostras inativadas por calor, posto que podem ocasionar resultados falsos positivos.

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO DESEMPENHO

### Sensibilidade Clínica

a) Sensibilidade clínica com painéis de soro conversão comerciais (BBI, Boston Biomedica, Inc)

Nome do painel	Dias desde o primeiro sangrado	Tempo (dias) no qual a amostra é reativa		
		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	Não reativo
PRB 952-BB	0, 7, 10, 14, 17, 21	17	14	17
PRB 953-BC	0, 3, 7, 10	10	7	Não reativo
PRB 966	0, 2, 20, 22, 30, 35, 37, 44, 48, 51	48	48	Não reativo

Indet: indeterminadas

### b) Sensibilidade clínica em Painéis de Performance

Em um estudo realizado com diferentes painéis comerciais internacionais, obtiveram-se os seguintes resultados:

- PRZ 207 (Anti-HIV-1/2 Combo Performance Panel): detectou-se 14 das 14 amostras reativas.
- PRZ 206 (Anti-HIV-1/2 Combo Performance Panel): detectou-se 11 das 124 amostras reativas.

### c) Sensibilidade em Painéis de Amostras reativas anti-HIV

Em um estudo realizado sobre 123 amostras de pacientes com infecção por HIV-1 confirmados por diferentes métodos, encontraram-se reativas a totalidade das amostras com o kit **HIV 1+2 ELISA 3ª Generación**.

### Especificidade

Em um estudo realizado sobre 3004 amostras de soros e plasmas provenientes de 5 centros de saúde diferentes, foram encontradas 33 amostras reativas das quais, 28 foram confirmadas por outros métodos, obtendo-se uma especificidade de 99,83%.

Estudou-se a possível aparição de reações cruzadas testando amostras provenientes de 272 indivíduos com diferentes condições clínicas que podem ser causas de reações inespecíficas para o ensaio HIV 1+2 ELISA 3ª Generación. Estas condições incluem amostras:

- com anticorpos contra HIV, HBV, EBV, CMV, HSV, VZV, HCV, HTLV e outros vírus;
  - com anticorpos contra *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Trypanosoma cruzi* e outros microorganismos;
  - com diferentes auto-anticorpos (AGA, AMA, ATA, FAN, fator reumatóide e outros). A especificidade em esta população foi 97,42%
- Em outro estudo sobre 91 plasmas de mulheres grávidas foi observada uma especificidade de 98,8%

### Precisão

Avaliou-se a precisão da prova seguindo o protocolo EP5A recomendado pela NCCLS. Os ensaios foram realizados com amostras de diferentes níveis de reatividade e com os controles. Realizaram-se 2 ensaios diários avaliando cada amostra por duplicado durante 20 dias.

Amostra	Média (D.O.)	Intra-ensaio		Inter-ensaio	
		D.P.	C.V.	D.P.	C.V.
A1	0,354	0,026	7,34%	0,037	10,45%
A2	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

## APRESENTAÇÃO

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

## REFERÊNCIAS

- 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.

## EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

<b>Policubeta</b>	<b>Sensib.</b>	<b>Buf. Lavado</b>	<b>Conc.</b>
Policubeta sensibilizada		Tampão de Lavagem Concentrado	
<b>Conjugado</b>		<b>Control +</b>	
Conjugado		Controle Positivo	
<b>Revelador</b>		<b>Control -</b>	
Revelador		Controle Negativo	

### Stopper

Stopper

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"

<b>EC REP</b>	Representante autorizado na Comunidade Europeia
<b>IVD</b>	Uso médico-diagnóstico "in vitro"
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data de validade
	Limite de temperatura (conservar a)
	Não congelar
	Risco biológico
	Volume após a reconstituição
<b>Cont.</b>	Conteúdo
<b>LOT</b>	Número de lote
	Elaborado por:
	Nocivo
	Corrosivo / Caústico
	Irritante
	Consultar as instruções de uso
<b>Calibr.</b>	Calibrador
<b>CONTROL</b>	Controle
<b>CONTROL +</b>	Controle Positivo
<b>CONTROL -</b>	Controle Negativo
<b>REF</b>	Número de catálogo

**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina