

ADVANCED HIV 1/2 ELISA TEST KIT

Cat. ACCU-ITP22001
VER.1

Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la Determinación de Anticuerpos contra el Virus del (HIV)

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo de la Enzima de HIV

USO DESTINADO

El producto ADVANCED HIV ELISA es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) tipo 1 y/o 2 (HIV-1/2) en suero o plasma humano. Es una prueba de escrutinio para los donadores de banco de sangre y de soporte en el diagnóstico clínico relacionado a la infección viral con el HIV-1 y/o HIV-2.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue descrito por primera vez en 1981 y se caracterizó por una serie de infecciones oportunistas con resultados fatales. El agente causal del SIDA se identificó en 1983 como un retrovirus desconocido y hasta hoy es conocido como Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1) (originalmente LAV, HTLV-III). En 1986, adicionalmente se aisló otro virus representativo de la inmunodeficiencia humana patológica (HIV-2). El HIV se transmite por instrumentos médicos no desinfectados adecuadamente (por ejm. Aguja contaminada), por sangre contaminada, por transmisión de la madre al hijo durante el nacimiento o durante la lactancia, asimismo hay otras maneras en las cuales el virus puede transmitirse en la población.

En 1985 como consecuencia, las pruebas para la detección de anticuerpos específicos para el HIV se iniciaron en los bancos de sangre y en las industrias que utilizan derivados de la sangre. La prueba de escrutinio ELISA fue bien aceptada. Para la confirmación de los resultados de las pruebas ELISA, se desarrolló la prueba de Western Blot específica para el HIV. Con la identificación de nuevos tipos de virus HIV-2 y variantes de HIV (HIV-0), comercialmente están disponibles nuevas pruebas de escrutinio ELISA, las cuales continuamente se han estado mejorando y optimizando en términos de sensibilidad.

De cualquier manera, una prueba ELISA no provee al 100% de seguridad en el diagnóstico de HIV. Por lo tanto, una prueba ELISA positiva deberá confirmarse utilizando otro método específico, tal como el Western Blot. Una prueba de ELISA negativa indica que no hay presencia de HIV-1/2, pero tampoco provee el 100% de seguridad. A pesar de esto, la prueba ELISA es comúnmente el método serológico más utilizado en los bancos de sangre para identificar con alto grado de certeza los individuos infectados con HIV. Mediante el uso de estas pruebas ha sido posible eliminar a muy alto grado la transmisión del HIV a través de la sangre y de productos sanguíneos.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El producto ADVANCED HIV ELISA es una prueba ELISA basada en un inmunoensayo "sándwich" de doble antígeno, el cual emplea una variedad

de antígenos HIV recombinantes: algunos (gp120/gp41/gp36/p24) adheridos en el fondo de los pocillos de las placas, y otros (gp120/gp41/gp36/p24) unidos a la peroxidasa del rabano picante (HRP) de la solución del conjugado.

Durante el ensayo, los anticuerpos de HIV existentes en la muestra reaccionarán con esos antígenos para formar un complejo inmune de antígeno-anticuerpo-antígeno HRP. Posteriormente las partes que no se unieron se lavarán durante el proceso del ensayo, se aplica el sustrato para identificar el resultado de la prueba. La presencia de un color azul en los pocillos de la placa indica que el resultado es reactivo para HIV. La ausencia de color indica un resultado no reactivo en la muestra.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Placa con pocillos recubiertos de Antígeno 1
2. Enzima conjugada
3. Control positivo
4. Control negativo
5. Solución A (Solución H₂O₂)
6. Solución B (Sustrato TMB)
7. Solución de paro (Ac. Sulfúrico 2M)
8. Buffer de lavado concentrado (20x)
9. Sellador de la placa
10. Bolsa de plástico

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas para dispensar volúmenes de 1 – 1000 µL
2. Puntas para pipetas
3. Incubador a 37°C
4. Agua destilada o desionizada
5. Lavador de placas Microelisas
6. Lector de tiras de pocillos o de placa con filtro 450 nm y filtro de referencia de 615-690 nm

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

1. Este producto es solamente para uso de diagnóstico *In vitro*.
2. Médicos o personal técnico solamente deberán de utilizar este producto.
3. Agitar suavemente cada reactivo antes de utilizarlo.
4. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad.
5. No mezcle reactivos de lotes diferentes.
6. Evitar contaminación microbiana de los reactivos.
7. Evitar la exposición de la solución TMB a la luz intensa, metales u oxidantes.

INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

1. **Material biológico potencialmente infeccioso: Este producto contiene componentes de sangre humana y se debe manejar como agente infeccioso.** Las pruebas conocidas no ofrecen una completa seguridad que los productos derivados de la fuente humana no transmiten la infección, por lo que, todos los derivados de la sangre se deben considerar como potencialmente infecciosos, asimismo es recomendado que éstos reactivos y muestras humanas



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

- se manejen de acuerdo a buenas prácticas de trabajo del laboratorio. Por seguridad del control positivo se ha inactivado por calentamiento.
- No fumar o comer en áreas donde se estén manejando las muestras o productos.
 - No pipetear con la boca. Usar guantes de plástico desechables cuando se manipulen reactivos o muestras y lavarse las manos con hipoclorito de sodio al 5%.
 - Las muestras infecciosas y derramamientos no ácidos deben limpiarse con hipoclorito de sodio al 5%.
 - Todos los materiales desechados deben desinfectarse adecuadamente antes de tirarlos. Tanto los materiales líquidos como sólidos deben someterse a la autoclave a 121°C al menos por una hora. Los desechos sólidos también pueden incinerarse, los desechos líquidos no ácidos también pueden diluirse a una concentración final de 1.0%. Los desperdicios líquidos requieren neutralizarse por 30 minutos para obtener una desinfección completa antes de desecharse.
 - Evitar el contacto del ácido sulfúrico con la piel y mucosas de membrana. Si llegara ocurrir se deberá lavar inmediatamente con agua.

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

- Obtener muestras de suero o plasma por los procedimientos regulares del laboratorio clínico. Separar el suero del coágulo o el plasma de la sangre tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
- Las muestras que contengan azida de sodio o materiales particulados pueden ocasionar resultados erróneos.
- Las muestras se deben refrigerar si no se utilizan dentro de los 3 días posteriores a la recolección. Las muestras congeladas se deben descongelar y mezclar antes de hacer el ensayo. Evitar congelar y descongelar las muestras por más de 2-3 veces antes de usarlas.

CONSERVACIÓN DEL REACTIVO

- Los reactivos del producto deben conservarse de 2-8°C. Utilizar los reactivos lo más pronto posibles.
- Si la placa no se utiliza completamente, cubrir los pocillos sin usar con el sellador de placa, meterlos en la bolsa de plástico con el desecante y dejarlos de 2-8°C.
- Revisar la solución de buffer concentrada por la presencia de cristales de sales. Si los cristales se han precipitado antes de usarla, calentar la solución a baño maría de 37 - 40°C hasta disolver los cristales.

PREPARACION DE BUFFER DE LAVADO

- A) Diluir 1 volumen del buffer de lavado concentrado con 19 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
- B) El buffer de lavado se puede conservar a temperatura ambiente por una semana.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Dejar que todos los reactivos y muestras estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de empezar el ensayo. Mezclar suavemente antes de usarlos. Ajustar el incubador a 37±1°C.
- Escriba en una hoja de reportes los números de las muestras y de los pocillos. Dos pocillos para el blanco, seis pocillos adicionales para los controles y uno para cada muestra.
- Agregar 50µL de cada muestra y control (3 controles positivos y controles negativos) en cada pocillo de acuerdo con la hoja de reportes. (Reservar dos pocillos para el blanco de reactivo).
- Agitar suavemente tapando la placa para evitar que el líquido se derrame y contamine las muestras adyacentes. No derrame líquido en los bordes de la placa.
- Incubar la placa a 37°C +/-2°C por 30 minutos.

- Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado y de acuerdo con el procedimiento del lavado. **A) El lavado deberá desarrollarse estrictamente de acuerdo con las instrucciones, lavados incompletos pueden ocasionar resultados falsos. B) Aspirar el contenido de los pocillos completamente en un frasco de desecho. Después llene los pocillos completamente en un frasco de evitar que se derrame. Dejar remojar (aprox. 30-60 segundos). Aspirar completamente, repetir los lavados y dejar remojar cuatro veces adicionales por un total de cinco lavados. C) Estar seguros que no queden líquidos remanentes en las tiras y en el contenedor de las tiras después de la última aspiración (ejem, con papel absorbente). En caso de ser necesario invertir la placa y dar un golpe firme sobre la toalla de papel absorbente para eliminar el exceso de buffer de lavado. **Nota: Lavados inadecuados causarían resultados falsos.****
- Agregar 100 µL de la solución de conjugado de trabajo enzimático a cada pocillo de reacción excepto para el blanco. **Nota: No toque el fondo de los pocillos para evitar resultados falsos.**
- Agite suavemente tapando la placa para evitar que el líquido se derrame y contamine las muestras adyacentes. No derrame líquido en los bordes de la placa.
- Incubar la placa a 37°C +/- 2°C por 30 minutos.
- Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado y de acuerdo con el procedimiento.
- Agregar 50 µl de la solución A y 50 µL de la solución B a cada pocillo.
- Incubar la placa a 37°C por 20 minutos.
- Agregar 50 µL de ácido sulfúrico 2M a cada pocillo, cubrir la placa.
- Medir la densidad óptica (DO) con un lector de ELISA a 450nm (filtro simple) o a 450nm (630nm como referencia) (filtro dual).

CONTROL DE CALIDAD

Los resultados de un ensayo serán válidos si se cumplieron los siguientes criterios:

- Blanco de sustrato. El valor de la absorbancia debe ser menor que o igual a (\leq) 0.100
- La absorbancia del control negativo después de restar el blanco de sustrato (CN). cada CN debe ser menor que o igual (\leq) 0.100. Si dos valores están fuera del rango, la corrida será inválida y por lo tanto el ensayo deberá repetirse.
- La absorbancia de los controles positivos después de restar el blanco de sustrato (CP). Promedio de los CP deberá ser mayor que o igual (\geq) 0.500. Si es más bajo, la corrida será inválida y el ensayo se deberá repetir.

CALCULOS Y RESULTADOS

- Absorbancia promedio de los controles positivos (PCx):

$$CPx = (CP1 + CP2 + CP3) / 3$$
- Absorbancia promedio de los controles negativos (NCx):

$$CNx = (CN1 + CN2 + CN3) / 3$$
- Valor del corte:
 Valor del corte (Cut-off) = 0.1 + NCx
 Cualquier NCx menor que (<) 0.05 debe ser medido como 0.05

Dividir la absorbancia de la muestra entre el valor del corte.

POSITIVO: La absorbancia de la muestra es mayor que o igual (\geq) valor del cut-off

NEGATIVO: La absorbancia de la muestra es menor que (<) valor del cut-off

Los resultados falsos pueden deberse por uno de los siguientes problemas técnicos:

- A) Arrastre de muestras muy reactivas debido a la contaminación con equipo o por puntas de pipetas.
- B) Contaminación de sustrato con iones de metal.
- C) Contaminación cruzada.
- D) Lavados inadecuados o por aspiraciones durante el proceso de lavado.
- E) Falla para quitar el exceso de humedad de la parte del fondo del pocillo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las muestras con resultados positivos o erróneos deben de reanalizarse por duplicados. Si el resultado es repetidamente positivo o erróneo, la muestra debe ser ensayada con otros métodos. Muestras positivas repetidamente deben ensayarse con un método confirmatorio adicional tales como Western Blot, inmunofluorescencia o RIBA.

Los ensayos óptimos requieren una aplicación estricta al procedimiento descrito. Desviaciones del procedimiento pueden ocasionar resultados aberrantes.

Como en todo los inmunoensayos altamente sensibles, hay la posibilidad que no ocurran resultados positivos repetibles.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición con HIV.

RESULTADOS ESPERADOS

El número de resultados positivos depende de la incidencia de la enfermedad del área geográfica y el tipo de población estudiada. En el mundo la incidencia de HIV en personas mayores de 15 años varía del 0.1% en Australia, Nueva Zelandia y el pacífico de Asia, 0.3% en Europa Occidental, Norte de África y Medio Oriente, 0.5% en Europa Oriental, Asia Central y Latinoamérica, 0.6% en Norte América y el sur de Asia y 9% en el África del sub-Sahara. En el mismo país, la incidencia también varía enormemente de acuerdo a la población estudiada. En Europa Occidental, la prevalencia de anticuerpos HIV en los donadores de sangre varía de 0 a 5 casos por 100,000 donaciones, mientras la incidencia entre prisioneros, trabajadores sexuales y drogadictos puede fácilmente alcanzar el 20% en estas poblaciones de riesgo.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

Los siguientes resultados se obtuvieron al analizar el desarrollo del producto ADVANCED HIV ELISA.

MUESTRAS	NUMERO ESTUDIADO	NUMEROS POSITIVOS
ANTI-HIV POSITIVO	466	466

ESPECIFICIDAD

La especificidad del producto ADVANCED HIV ELISA se investigo en un laboratorio independiente con 9805 muestras de suero de donadores de sangre sanos, 19 muestras se encontraron reactivas (99.8%).

En éste estudio la especificidad obtenida fue del 99.8%.

Los siguientes resultados se obtuvieron al analizar el producto ADVANCED HIV ELISA utilizando como referencia los controles del laboratorio Clínico Nacional de China.

MUESTRAS		RESULTADO PRUEBA
18 controles positivos de HIV-1	P1-P18	+
2 controles positivos de HIV-2	P19-P20	+
Muestras con Anticuerpos Gp41 en el limite más bajo de detección 20 controles negativos de HIV	S22	-
	S23-S25	+
	N1-N20	-

REFERENCIAS

- Barre-Sinoussi F, Cherman J C, Rey F, et al. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871, 1983.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) From patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503, 1984.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, et al. What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10, 1986.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F: Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346, 1986.
- De Cook KM, Brun-Vezinet F: *Epidemiology of HIV-2 Infection. AIDS* 1989 3:S89-S5, 1989.
- Centers for Disease Control. AIDS due to HIV-2 infection New Jersey. *MMWR* 37:33-35, 1988.
- Hoff R, Weiblen BJ, Schwertler M, et al. Specific antibodies to HIV-2 detected in an anonymous newborn blood specimen from Massachusetts. *Fourth Consensus Conference on Testing for Human Retroviruses, March 1989.*
- Ayanian JZ, Maguire JH, Marlink RG, et al. HIV-2 infection in the United States. *New Engl J Med* 320: 1422-1423, 1989.
- O'Brien TR, George JR, Holmberg SD. Human immunodeficiency virus type 2 infection in the United States. *JAMA* 267: 275-2779, 1992.
- Brun-Vezinet F, Katlama C, Roulot D, et al. Lymphadenopathy associated virus type 2 in AIDS and AIDS-related complex. *Lancet* 1:128-132, 1987.
- Quinn TC, Zaccarias FRK, St. John RK, AIDS in the Americas: an emerging public health crisis. *New Engl J Med* 320: 1005-1007, 1989.
- Guyader M, Emerman M, Sonigo P, et al. Genoma organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326: 662-669, 1987.
- Cabrian k, Shiver K, Goldstein L, et al. Human Immunodeficiency virus type 2: a review. *J. Clinical Immunoassay* 11: 107-114, 1988.
- George JR, Rayfield M, Schochetman G, et al: Sensitivity of U.S. FDA licensed HIV-1 enzyme immunoassays for detection of HIV-2 antibodies. *Abstracts: 1989 V International Conference on AIDS, section B, Page 306.*

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTEC PRODUCTS INC
332 XINGUAN ROAD, XINYANG INDUSTRY
AREA, HAICANG XIAMEN, 361022,
R.P. CHINA