



Cat. No. ITP22004

## HIV Ag-Ab ELISA

### Kit de Diagnóstico para Antígenos / Anticuerpos para el Virus de Inmunodeficiencia Humana (ELISA)

#### USO PREVISTO

La prueba Advanced HIV Ag-Ab es una prueba ELISA para la detección cualitativa y diferencial de anticuerpos para los virus tipos 1 y 2 de inmunodeficiencia humana (VIH1 y VIH2) y la detección simultánea del antígeno p24 en suero humano o plasma. Está previsto para el cribado de donadores de sangre y para la ayuda en el diagnóstico de condiciones clínicas relativas a la infección con VIH1 y/o VIH2.

#### COMPENDIO

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue descrito por primera vez en 1981 y se caracteriza por una serie de infecciones oportunistas con un resultado de la enfermedad fatal. El agente causante del SIDA fue identificado en 1983 como retrovirus previamente desconocido, que hoy se denomina el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) (originalmente LAV, HTLV-III). En 1986, se aisló un representante más de los virus de la inmunodeficiencia humano patógena (VIH-2).

Hoy en día no hay medidas preventivas para la infección por VIH y los métodos existentes de la terapia antiviral no garantizan la recuperación completa del SIDA. En la etapa temprana del VIH se pueden detectar anticuerpos de seroconversión para la principal proteína p24 del VIH con ELISA en un promedio de 3-6 semanas después de la infección. Las glicoproteínas más inmunogénicas son gp160, gp120 y gp41, los anticuerpos suelen aparecer tarde para ellos. En primer lugar, por lo general aparecen anticuerpos IgM para proteínas básicas que están presentes en el suero durante la circulación de partículas virales en la sangre humana.

Las principales formas de transmisión del VIH son contactos sexuales, la contaminación de la sangre y cierto producto sanguíneo, transmisión del virus de la madre al feto o al niño. El papel principal en el camino hacia la limitación de la enfermedad pertenece a las acciones que se dirigen a la identificación de las unidades potencialmente infecciosas de la sangre o plasma donado. La práctica más popular de investigación serológica es la detección de anticuerpos contra el VIH con ELISA.

Hoy se han logrado considerables mejoras de la sensibilidad de ELISA y se redujo el tiempo entre la infección con el VIH y el momento en que los anticuerpos pueden detectarse ("ventana de seroconversión"). Son posibles nuevas medidas en la dirección de reducir esa "ventana" en caso de incorporación del antígeno p24 del VIH detectando paralelo con anticuerpos contra el VIH, que reduce el período de seroconversión por 7-10 días y por lo tanto, permite la detección precoz de la infección por el VIH.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los principales componentes del kit de prueba son microplacas y conjugados inmunoenzimáticos. La microplaca es placa de poliestireno es recubierta con anticuerpos monoclonales para el antígeno de VIH (p24) y la mezcla de los antígenos VIH recombinantes. Los conjugados inmunoenzimáticos se presentan como sigue: anticuerpos policlonales para el antígeno p24 del VIH marcado con biotina, conjugado de antígenos del VIH recombinantes con peroxidasa de rábano picante y conjugado de peroxidasa de estreptavidina. Cuando especímenes infectados investigados de plasma o suero humano se colocan en los pocillos de la inmunoplaca, el antígeno p24 se une a ambos anticuerpos específicos sobre la fase sólida y los anticuerpos policlonales para los p24 marcados con biotina que componen el conjugado 1, y los anticuerpos específicos para el VIH están unidos a ambos antígenos del VIH recombinantes en la fase sólida y los antígenos del VIH conjugados con peroxidasa de rábano picante componen el conjugado 2 formando los complejos de antígeno-anticuerpo. Los complejos inmunes con anticuerpos específicos anti-p24 y p24 antígeno son detectados por los peroxidasa de estreptavidina que componen el conjugado 2. Después de que el material no unido se elimina mediante lavado durante el procedimiento de ensayo, el sustrato se aplica para indicar el resultado de la prueba. La aparición del color azul en los pocillos de microtitulación indica resultado reactivo VIH. La ausencia del color indica resultado no reactivo en la muestra.

#### Tamaño del empaque: 96T

#### CONTENIDOS DEL KIT

Placa de microtitulación revestida de antígeno/anticuerpo	1 placa (96T)
Conjugado 1	1 x 3.5 ml
Conjugado 2	1 x 12 ml
Control Positivo (VIH-1 Ab)	1 x 1 ml
Control Positivo (VIH-2 Ab)	1 x 1 ml
Control Positivo (VIH P24)	1 x 1 ml
Control Negativo	1 x 1 ml
<i>Los reactivos arriba mencionados deben ser almacenados a 2-8°C.</i>	
Color A (Solución H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1 x 14 ml
Color B (sustrato TMB)	1 x 14 ml
Solución de parada	1 x 14 ml
Buffer de lavado concentrado (20x)	2 x 24 ml

Sellador de placa	3 pcs
Bolsa plástica	1 pc

*Los reactivos arriba mencionados deben ser almacenados a 2-30°C.*

### **MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS**

Pipetas con capacidad de 1~1000 µl

Puntas de pipeta

Incubador a 37°C

Agua fresca deionizada o destilada

Lavador de microplacas

Bandas de micropocillos o lector de placas con 450 nm de longitud de onda de medición y filtro de referencia (615 - 690 nm)

### **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

ESTE PRODUCTO ES PARA DIAGNOSIS IN VITRO SOLAMENTE

Solo médicos o técnicos médicos deben manejar este kit de reactivos

Agite suavemente cada reactivo antes de la prueba

No usar este kit después de la fecha de vencimiento

Componentes individuales o montos residuales no deben ser usados en combinación con kits de diferentes lotes

Evitar la contaminación microbiana de los reactivos

Evite la exposición del color B a la luz fuerte, metal u oxidantes. Esta debe ser incolora, de lo contrario debe ser descartada.

### **INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD**

ADVERTENCIA- MATERIALES DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO: ESTE KIT CONTIENE COMPONENTES DE SANGRE HUMANA, MANEJARLOS COMO CAPACES DE TRANSMITIR AGENTES INFECCIOSOS. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que los productos derivados de material de origen humano no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos, se recomienda que estos reactivos y muestras humanas sean manejados con prácticas de trabajo de laboratorio bien establecidas. El Control Positivo ha sido inactivado por tratamiento térmico.

No fumar ni comer en las zonas donde las muestras o kits que sean manipuladas.

No pipetear con la boca. Usar guantes desechables de PVC cuando maneje reactivos o muestras, y lavarse bien las manos con hipoclorito de sodio al 5%.

Las muestras infecciosas y los derrames que contengan no ácidos deben ser limpiados a fondo con hipoclorito de sodio al 5%.

Todos los materiales de desecho deben desinfectarse adecuadamente antes de su eliminación. Tanto los residuos líquidos como los sólidos debe ser autoclavados a 121° C durante al menos 1 hora. Los desechos sólidos también pueden ser incinerados. Los residuos líquidos no ácidos pueden ser diluidos a una concentración final de 1.0%. Los

desechos líquidos ácidos requieren neutralización antes de un tratamiento similar y deben reposar durante 30 minutos para obtener una desinfección eficaz.

Evite el contacto de la solución de parada con la piel o las membranas mucosas. Si entra en contacto con la piel, lavar con agua del grifo inmediatamente.

### **RECOLECCION DE MUESTRAS Y ALMACENAJE**

1. Recoger muestras de suero y plasma siguiendo los procedimientos de laboratorio clínico regulares. Separar el suero del coágulo o el plasma de los glóbulos rojos tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
2. Las muestras que contienen azida de sodio o partículas pueden dar resultados erróneos.
3. Las muestras deben ser refrigeradas si no se utilizan dentro de los 3 días de la recogida. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse antes de la prueba. Evite la congelación y descongelación de las muestras más de 2-3 veces antes de usar.

### **ALMACENAJE DEL REACTIVO**

1. El kit de reactivos debe ser almacenado a 2-8 °C. Utilice los reactivos tan pronto como sea posible después de desempacar el kit.
2. Si la placa no se utiliza completamente, cubra los pocillos no utilizados con el sellador de placas, póngalos en la bolsa de plástico junto con el desecante y guárdelos a 2~8°C.
3. Compruebe el buffer de lavado concentrado por la presencia de cristales de sal. Si el cristal se ha precipitado antes de su uso, calentar la solución en un baño de agua a 37-40°C hasta que se disuelva el cristal.

### **PREPARACION DEL BUFFER DE LAVADO**

1. Diluir 1 volumen de buffer de lavado concentrado con 19 volúmenes de agua deionizada o destilada. Mezclar bien.
2. El buffer de lavado debe ser almacenado a temperatura ambiente durante 1 semana.

### **PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO**

1. Lleve todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (18~25°C) antes del ensayo. Agitar suavemente antes de su uso. Ajustar una incubadora a 37±1°C.
2. Anote el número de especímenes y pocillos en la ficha de datos. Un pocillo para los espacios en blanco, seis pocillos adicionales para los controles y un pocillo para cada espécimen.
3. Añadir 25µl de conjugado 1 en cada pocillo apropiado. (Reserve 1 pocillo para el espacio en blanco).

- Añadir 75µl del espécimen de control (3 controles positivos y 3 controles negativos) en cada pocillo apropiado de acuerdo a la ficha de datos. (Reserve 1 pocillo para el espacio en blanco).
- Golpee suavemente la placa para mezclar profundamente el líquido en los pocillos, no salpicar líquido sobre la combinación.
- Incubar la placa en una incubadora a 37°C durante 60 minutos.
- Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado según el procedimiento de lavado:

**Nota:**

El lavado debe realizarse estrictamente de acuerdo con las instrucciones, un lavado incompleto puede causar un falso resultado.

Aspirar completamente los contenidos de los pocillos en un frasco de residuos. Luego llenar los pocillos con buffer de lavado (350µl o más), evitar el desbordamiento. Dejar en remojo (aprox. 30-60 segundos). Aspirar completamente y repetir el lavado y el procedimiento de remojo cuatro veces adicionales para un total de cinco lavados.

Asegúrese de que ningún líquido permanece en el soporte de bandas y recorte después de la última aspiración (por ejemplo, mediante secado con papel absorbente).

Un lavado inadecuado causará un resultado falso.

- Añadir 100µl del conjugado 2 dentro de cada pocillo de reacción excepto en el blanco. Nota: No tocar el borde del pocillo para evitar un resultado falso.
- Golpee suavemente la placa para mezclar bien el líquido en los pocillos, no salpicar líquido sobre la combinación.
- Incubar la placa en una incubadora a 37°C por 30 minutos.
- Lavar cada pocillo cinco veces con buffer de lavado según el procedimiento de lavado.
- Añadir 50µl de Color A y 50µl de Color B a cada pocillo.
- Incubar la placa en una incubadora a 37°C por 30 minutos.
- Añadir solución de parada a cada pocillo; golpear gentilmente la placa.
- Mida OD con un lector de micro-pocillo a 45 nm (longitud de onda única) ó 450 y 630 nm como referencia (doble longitud de onda).

### **CONTROL DE CALIDAD**

Los resultados de un ensayo son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

- El sustrato en blanco: el valor de absorbancia debe ser menor que o igual a ( $\leq$ ) 0.100.
- La absorbancia del control negativo después del sustrato en blanco. NC: cada NC debe ser menor que o igual a ( $\leq$ ) 0.100. Eliminar cualquier NC mayor que ( $>$ ) 0.100. Si los dos valores están fuera de este rango, la ejecución es inválida y el ensayo debe ser repetido.
- La absorbancia del control positivo después del sustrato en blanco.(PC): El promedio del PC debe ser mayor que o igual a ( $\geq$ ) 0.500. Si es menor la ejecución es inválida y el ensayo debe ser repetido.

### **CALCULOS Y RESULTADOS**

- Absorbancia promedio del Control Negativo (NCx).

$$NCx = (NC1+NC2+NC3)/3$$

Eliminar cualquier NC mayor que ( $>$ ) 0.00.

- Valor de corte:

$$\text{Valor de corte} = 0.1 + NCx$$

Cualquier NCx menor que ( $<$ ) 0.05 debe considerarse como 0.05.

- Dividir la absorbancia de la muestra por el valor de corte.

Positivo: la absorbancia de la muestra es mayor que o igual a ( $\geq$ ) el valor de corte.

Negativo: la absorbancia de la muestra es menor que ( $<$ ) el valor de corte.

### **INTERPRETACION DE RESULTADOS**

Los resultados de reactivos falsos pueden ser causados por uno de los siguientes problemas técnicos:

- El arrastre de una muestra altamente reactiva debido a la contaminación con equipos o puntas de pipetas.
- Contaminación del sustrato con iones metálicos.
- La contaminación cruzada de la gota del reactivo.
- Lavado inadecuado o aspiraciones durante el procedimiento de lavado.
- Si no se retira el exceso de humedad desde el fondo del pozo.

### **LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS**

Las muestras con resultado positivo o dudoso deben ser re-analizadas por duplicado. Si el resultado es positivo o equívoco en repetidas ocasiones, la muestra debe investigarse más a fondo con otros métodos. Las muestras repetidamente positivas deben ser re-examinadas con un ensayo de confirmación adicional, como la inmunofluorescencia (IFA) o mancha occidental.

El rendimiento óptimo del ensayo requiere el cumplimiento estricto del procedimiento de ensayo descrito. La desviación de procedimiento puede dar lugar a resultados aberrantes. Como en todo inmunoensayo sensitivo, existe la posibilidad de que los resultados positivos no repetibles ocurran.

*Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o la infección por el VIH.*

### **RESULTADOS ESPERADOS**

El número de resultados positivos depende de la incidencia de la enfermedad en el área geográfica y del tipo de población examinada. En el mundo, la incidencia de VIH en personas mayores de 15 años varía de un 0.1% en Australia, Nueva Zelandia y Asia Pacífico, 0.3% en Europa Occidental, Africa del Norte y Medio Este, 0.5% en Europa Oriental, Asia Central y Latinoamérica, 0.6% en Norteamérica y Asia del Sur y 9% en Africa Sub-Sahariana. En el mismo país la incidencia también varía enormemente de acuerdo a la población examinada. En Europa Occidental, la prevalencia de anticuerpos VIH en las donaciones en banco de sangre varía de 0 a 5 casos sobre las 100,000 donaciones, mientras que la

incidencia en torno a los presos, trabajadores sexuales y usuarios de drogas puede llegar fácilmente al 20% en estas poblaciones de riesgo.

### CARACTERISTICAS DEL RENDIMIENTO

Los siguientes resultados se obtuvieron al probar el rendimiento del kit de diagnóstico de antígeno / anticuerpo al virus de inmunodeficiencia humana (ELISA) utilizando el control de Laboratorio Clínico Nacional de China como referencia:

#### 1. Panel de Anticuerpos

Muestras		Resultados de las pruebas
18 controles positivos anti-VIH-1	P1-P18	+
2 controles positivos anti-VIH-2	P19-P20	+
Muestras de anticuerpo gp41 en el límite más bajo de detección	S1	-
	S2-S6	+
20 controles negativos anti-VIH	N1-N20	-

#### 2. Panel de Antígenos

Muestras		Resultados de las pruebas
Controles positivos de antígeno p24	P1-P10	+
Muestras de antígeno p24 en el límite más bajo de detección	L1-L9	+
	L-10	-
20 controles negativos de antígeno	N1-N20	-

### BIBLIOGRAFIA

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, 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.
2. 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.
3. Coffin J, Haase A, Levy JA, et al. What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10, 1986.
4. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F: Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346, 1986.

5. De Cock KM, Brun-Vezinet F: Epidemiology of HIV-2 infection. *AIDS* 1989 3:S89-S5, 1989.
6. Centers for Disease Control. AIDS due to HIV-2 infection -New Jersey. *MMWR* 37:33-35, 1988.
7. Hoff R, Weiblen BJ, Schwerzler 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.
8. Ayanian JZ, Maguire JH, Marlink RG, et al. HIV-2 infection in the United States. *New Engl J Med* 320: 1422-1423, 1989.
9. O'Brien TR, George JR, Holmberg SD. Human immunodeficiency virus type 2 infection in the United States. *JAMA* 267: 2775-2779, 1992.
10. 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.
11. Quinn TC, Zaccarias FRK, St. John RK. AIDS in the Americas: an emerging public health crisis. *New Engl J Med* 320: 1005-1007, 1989.
12. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, et al. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326: 662-669, 1987.
13. Cabrian K, Shrivert K, Gold Stein L, et al. Human immunodeficiency virus type 2: a review. *J Clinical Immunoassay* 11: 107-114, 1988.
14. 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.
15. Courouce AM and the Retrovirus Workgroup at the S.F.T.S. 1999. Combines screening tests for anti-HIV antibodies and p24 antigen. *La gazetta de la Transfusion*, 155:4-18.
16. Gurtler LA, Muhlbacker U, Michl H, et al. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assays [J]. *J Virol Methods*, 1998, 75:27-38.
17. Weber B, Gurtler L, Thorstensson R, et al. Multicenter evaluation of a new automated fourth-generation human immunodeficiency virus screening assay with a sensitive antigen detection module and high specificity [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40:1938-1946.