

## VIH

### Virus Inmunodeficiencia Humana (1+2)

#### Método Sándwich doble antígenos (ELISA)

#### 1.0. USO PREVISTO

Este kit ELISA VIH-1,2 debe usarse para la detección in vitro de anticuerpos del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2) en suero plasma. Se destina para la detección inicial de anticuerpos del VIH-1,2, no para la determinación.

#### 2.0. INTRODUCCION

Este kit ELISA VIH-1,2 emplea sintéticos VIH polipéptidos y proteínas VIH recombinante para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2. Estos polipéptidos y proteínas recombinantes, las cuales corresponden a epitopos antigénicos altamente formados por secuencias esenciales derivados tanto de la envoltura y núcleo de las proteínas de VIH-1 y VIH-2, constituyen la fase sólida antigénica absorbente. El kit ELISA VIH-1,2 ofrece una sensitiva, confiable y exacta interpretación de las reactividades al VIH con un período de incubación de 60 minutos.

#### 3.0. PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

Esta enzima anticuerpos VIH-1,2 vinculada prueba ELISA kit emplea una técnica llamada método sándwich cualitativa inmunoensayo. La placa de microtitulación de este kit ha sido pre-revestido con VIH polipeptidos sintéticos y proteínas recombinantes VIH, las cuales corresponden a epitopos antigénicos altamente formados por secuencias esenciales derivados tanto de la envoltura y núcleo de las proteínas de VIH-1 y VIH-2, constituyen la fase sólida antigénica absorbente. Muestras y control se agregan a los pocillos de microplacas y se incuban. Anticuerpos específicos de VIH, si se presentan, se unen y quedan inmovilizados por los antígenos precubiertos en los pocillos. Los pocillos de microplacas se lavan a fondo para eliminar los anticuerpos no unidos de VIH y otros componentes de la muestra. Una preparación estandarizada de la peroxidasa de rábano (HRP)-conjugada con polipeptidos sintéticos VIH y proteínas recombinadas VIH se añaden a cada pocillo para "sándwich" lo anticuerpos de VIH inmovilizados durante la primera incubación. A continuación, los pocillos de microplacas se someten a una segunda incubación. Los pocillos son lavados a fondo para remover los HRP-conjugado no unidos y una solución de sustrato TMB (3,3', 5,5' tetrametil-bencidina) se añade a cada pocillo. La encima (HRP) y el sustrato se dejan reaccionar durante un corto periodo de incubación. Solo los pocillos que contienen anticuerpos VIH y encima conjugadas exhibirán un cambio en color. La reacción enzima-sustrato es terminada por la adición de solución de ácido sulfúrico y el cambio de color es medido espectrofotométricamente en una longitud de onda de 450 nm.

Muestras con valores O.D. mayores que o igual a el valor de cut-off son consideradas reactivos por el criterio de este kit ELISA de anticuerpos VIH-1, 2.

#### 4.0. REACTIVOS INCLUIDOS

Todos los reactivos incluidos son conservados a 2-8°C. Hacen referencia a la fecha de expiración indicado en la etiqueta.

##### 4.1 Microplacas recubiertas:

Una microplaca con 96 pocillos recubiertos con polipéptidos VIH-1 & VIH-2 y proteínas recombinantes de VIH. Conservar a 2-8°C.

##### 4.2 Enzima Conjugada:

Un vial (7.5 ml) conteniendo un solución de peroxidasa de rábano (HRP) conjugada VIH-1 & VIH-2 polipéptidos y proteínas recombinantes. Conservar a 2-8°C.

##### 4.3 Control Negativo:

Un vial (1,0 ml) de suero humano normal inactivado diluido en diluyente de la muestra. Conservar a 2-8°C.

##### 4.4. Control Positivo:

Un vial (1,0 ml) de VIH-1 +2 positivo de anticuerpos de suero humano inactivo diluido en un diluyente de la muestra. Conservar a 2-8°C.

##### 4.5. Solución de Sustrato A

Un vial (7,5 ml) conteniendo urea peróxido de hidrógeno. Conservar a 2-8°C.

##### 4.6. Solución de Cromógeno B

Un vial (7,5 ml) conteniendo 3,3' -5,5' de tetrametilbenzidina estabilizada (TMB). Conservar a 2-8°C.

##### 4.7. Solución Stop

Un vial (7,5 ml) conteniendo 1.0 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Listo para usar. Conservar a 2-8°C.

##### 4.8. Solución de lavado (20X conc.)

Un vial (50 ml) conteniendo fosfato salino regulado.

##### Preparación de la solución de lavado:

Dentro de un Becker graduado de al menos 100 ml de capacidad, verter el contenido completo de la solución de lavado concentrado (50 ml). Enjuague el vial con agua estilada y verter también esta agua destilada dentro del Becker hasta el volumen total de 1000 ml. Transferir el contenido del Becker dentro de una botella de 1500 ml para conservar.

#### 5.0. EQUIPOS Y MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

5.1. Micropipetas de precisión y tips: 5-100ul

5.2. Incubadora (+37°C).

5.3. Lavador automático de placas

5.4. Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm

5.5. Almohadilla absorbente o papel.

5.6. Agua destilada

5.7. Mezclador Vortex

5.8. Guantes desechables

#### 6.0. PRECAUCIONES

6.1. No sustituya los reactivos de un kit a otro. Controles, conjugado, y las placas de microtitulación están acordes para un rendimiento óptimo. Deben utilizarse únicamente reactivos suministrados por el fabricante.

6.2. Los reactivos del kit deben estar a temperatura ambiente (20-25° C) antes de su uso. No utilice baños de maría para descongelar o los reactivos.

6.3. No utilizar los componentes del kit después de su fecha de vencimiento.

6.4. Sólo utilice agua desionizada o destilada para diluir los reactivos.

6.5. No retire la placa de microtitulación de la bolsa de almacenamiento hasta que se necesite. las tiras que no se utilicen se deben almacenar a 2-8°C en una bolsa con su desecante correspondiente.

6.6. Use nuevas puntas de pipeta desechables para cada transferencia para evitar la contaminación.

6.7. No mezcle soluciones de hipoclorito de sodio y ácido.

6.8. Suero y plasma humanos deben ser tratados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Se deben usar guantes desechables durante el procedimiento de ensayo, ya que ningún método de prueba puede ofrecer completa seguridad de que los productos derivados de la sangre humana no transmitan agentes infecciosos. Por lo tanto, todos los derivados

de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos y siempre deben seguirse las buenas las prácticas de laboratorio.

6.9. Todos los materiales deben ser desechados de una manera que se van inactivando los virus humanos.

Residuos sólidos: autoclave 60 minutos a 121°C. Residuos líquidos: añadir hipoclorito de sodio a una concentración final de 1,0%. Los residuos se deben dejar reposar un mínimo de 30 minutos para inactivar los virus antes de su eliminación.

6.10. El sustrato B contiene 20% de acetona, mantenga reactivo lejos de fuentes inflamables.

6.11. Si el tampón de lavado (20x) se almacena a una temperatura más baja (2-5°C), se pueden formar cristales que deben ser disueltos por calentamiento a 37 ° C antes de su uso.

## 7.0. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA, RECOGIDA, MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

### MUESTRA

7.1. **Suero:** La sangre debe ser recolectada utilizando técnicas estándares de punción venosa y suero separado de las células tan pronto como sea posible.

Las muestras deben dejarse coagular por una hora a temperatura ambiente, centrifugado por 10 minutos (4°C) y suero extraído.

7.2. **Plasma:** La sangre debe ser recolectada utilizando técnicas estándares de punción venosa y plasma recolectado usando citrato de sodio, EDTA, o heparina como anticoagulante. Para asegurar una recuperación óptima y la mínima contaminación de plaquetas, después de la recolección debe haber una separación rápida de suero con menos de 30 minutos en hielo. Centrifugar durante 10 minutos (4°C) para remover cualquier partícula. Este anticuerpo VIH-1, 2 kit ELISA no es afectado por hemodiálisis de especímenes.

7.2.1. Evitar muestras excesivamente hemolíticas, lipídicas o turbias.

7.2.2. Muestras de suero o plasma deben ser usadas dentro de las 24-48 horas se pueden almacenar a 2-8°C, de lo contrario, las muestras deben conservarse a -20° para evitar pérdida de bioactividad y contaminación. Evitar ciclos de congelación y descongelación.

7.2.3. Al realizar el ensayo lentamente llevar las muestras a temperatura ambiente.

7.2.4. Se recomienda que todas las muestras se analicen duplicadas,

7.2.5. No use muestras tratadas.

## 8.0. ALMACENAMIENTO DEL KIT

El kit de pruebas cerradas debe ser almacenado a 2-8° y la placa de microtitulación se debe mantener en una bolsa sellada para minimizar la exposición a la humedad del aire. Utilice los reactivos tan pronto como sea posible después de abierto el empaque.

## 9.0. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

9.1. Llevar todos reactivos y muestras a temperatura ambiente (15°C 30°C) antes de comenzar el ensayo. Agitar suavemente antes de usarlo. Ajuste la incubadora a +37°C, de ser necesario.

9.2. Escribir los números relativos de muestras y pocillos en la hoja de datos. Un pocillo para el blanco, cinco pocillos adicionales para los controles y un pocillo para cada muestra. Si el experimento no necesita toda la placa, retire las tiras restantes en la bolsa de ziplock (incluida en el kit) que contiene desecante.

9.3. Reserva un pocillo para el blanco, agregar 50ul del control negativo para cada uno de los tres pocillos, 50ul del control positivo de cada una de los dos pocillos, y 50ul de cada espécimen en un pocillo de acuerdo con el siguiente esquema:

1 A	: Blanco
2 A, 3 A, 4 A	: Suero de control negativo
5 A, 6 A	: Suero de control positivo
7 A	: Muestras

**Nota:** use tips individuales para cada pipeta para evitar contaminaciones cruzadas.

Si se requieren más de 2 ó 3 corridas por placa y los aparatos utilizados son fiables, se puede pipetear el Control Negativo por duplicado y el control positivo en singleton.

9.4. Incube la placa en una incubadora a +37 ° C durante 30 minutos

9.5. Al final de la incubación, lavar las tiras 6 veces con la solución de lavado, ya sea manualmente o con lavadora automática.

Después del último lavado, asegurarse de que toda solución es perfectamente removida de cada pocillo.

**Nota:** Un procedimiento de lavado adecuado es esencial para el buen funcionamiento del ensayo.

9.6. Añadir 50ul de conjugado enzimático a cada pocillo (excepto el pocillo del blanco). Mezcle suavemente con movimientos circulares la placa de microtitulación en un banco plano e incube durante 30 minutos a 37°C.

9.7. Lavar la placa 6 veces de acuerdo a lo indicado en el paso 5.

9.8. Dispensar 50ul de sustrato cromógeno A y B, incluyendo 1A. Mezclar horizontalmente e incubar durante 10 minutos a 37° C (evitar la exposición directa con la luz del sol).

9.9. Detener la reacción añadiendo 50ul de reactivo de bloqueo para llegar bien (incluido el blanco) en el mismo orden adoptado para la adición de la solución de sustrato cromogénico.

9.10. Después de añadir la solución de bloqueo, leer el color que aparece en el lector de microplacas a 450 nm. La lectura se debe hacer dentro de los 30 minutos de haberse detenido la reacción.

**Nota:** El lector debe ser borrado a 450nm contra el blanco. Se recomienda una medición de la absorbancia bicromático con una longitud de onda de referencia de 620nm cuando sea posible.

9.11. Registrar los resultados de absorbancia en una hoja de datos. Incluir el número de lote del kit, la fecha, operador y cualquier otra nota acerca de la corrida. Si una copia impresa de la lectura de la absorbancia está disponible, adjúntela a la hoja de datos.

## 10.0. PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Las placas de microtitulación pueden lavarse manualmente o automáticamente, en cuyo caso es absolutamente necesario programar el lavador de microplacas de acuerdo a las siguientes direcciones:

Aspirar la mezcla de incubación de los pocillos de la primera tira y dispence 350 ul de solución de lavado. Poco después procese las demás tiras de la misma manera. Repita este procedimiento por 5 veces más para un total de 6 ciclos, asegurándose de que la solución de lavado se quede en el pocillo por lo menos 30 segundos (tiempo de remojo) en cada ciclo. Un procedimiento de

lavado adecuado es esencial para un buen funcionamiento del ensayo.

#### 11.0. VALIDEZ DE LA PRUEBA

La prueba es válida si:

- a) La media del control negativo es inferior a 0.10 O.D.
- b) La media del control positivo es igual o mayor que 0.70 O.D.
- c) (media del control positivo O.D.) – (media del control negativo O.D.) > 0.60

#### 12.0. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE CUT-OFF E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA MUESTRA

12.1. El valor de cut-off =  $0.1 + NCx$  (significa Control Negativo)

Si el valor de la OD del control negativo es inferior a 0,05, debe reportarse como 0,05. Si es más de 0.05, debe reportarse como el valor actual de OD medido.

Ejemplo:  $NCx = 0.032$

Cut-off =  $0.1 + 0.005 = 0.105$

Cualquier muestra, en la que la absorbancia es igual o superior al valor de cut-off, se considera VIH positivo. Cualquier muestra, en la que la absorción es menor que el valor de cut-off, se considera VIH negativo.

#### 13.0 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

13.1. Muestras con valores O.D. MENORES QUE el valor de CUT-OFF son consideradas NO-REACTIVA para anticuerpos de VIH-1,2, en criterio de este kit ELISA de anticuerpos VIH-1, 2.

13.2. Muestras con valores O.D. MAYORES QUE ó igual al valor de CUT-OFF son consideradas INICIALMENTE REACTIVAS para anticuerpos de VIH-1,2, según criterio de este kit ELISA de anticuerpos VIH-1, 2, y la prueba original debe ser rediluida y vuelta a probar, por duplicado antes de su interpretación.

13.3. Muestras Inicialmente reactivas que den resultados como no- reactivo en nuevas pruebas se consideran negativas, en los criterios de este kit ELISA de anticuerpos VIH-1, 2.

13.4. Muestras que se encuentran reactivas en su repetición se interpretan como REPETIDAMENTE REACTIVAS para los

anticuerpos al VIH-1, 2, en los criterios de este kit ELISA de anticuerpos VIH-1, 2.

13.5. Si la muestra es encontrada repetidamente reactiva, hay una alta probabilidad de que contiene anticuerpos al VIH-1 y/o VIH-2, especialmente si se trata de un paciente que está en riesgo de infección o el valor de la O.D. valor es muy alto. Es recomendable que las pruebas repetidamente reactivas sean investigadas por otras pruebas más específicas como Western Blot, la inmunofluorescencia o la radioinmuno-precipitación, las cuales son capaces de identificar anticuerpos más específicos del VIH-1,2. La interpretación de los resultados en las pruebas encontradas repetidamente reactivas por ELISA y negativa por otras pruebas más específicas es dudosa; por lo cual se debe repetir la prueba con otra muestra dentro de tres a seis meses para clarificar los resultados.

#### 14.0 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

El VIH-1 y la sensibilidad del VIH-2 es 100% para la detección de anticuerpos en individuos infectados con VIH-1 y/o VIH-2. La especificidad, cuando sobre la base de la supuesta tasa de prevalencia cero de anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2 en los donantes al azar, es del 99,7%

#### 15.0 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento de análisis e interpretación de las secciones de resultados deben observarse cuidadosamente al probar el suero o plasma de los sujetos individuales para detectar la presencia de anticuerpos al VIH. Este VIH-1, 2 ELISA fue diseñado para probar las unidades individuales de suero o plasma, por lo que la mayoría de los datos relativos a su interpretación se derivan de las pruebas de las muestras individuales. No hay datos suficientes para interpretar las pruebas realizadas a otras muestras del cuerpo, agrupados de sangre o plasma procesado y/o productos a base de tales agrupaciones. Prueba de estas muestras no son recomendadas.

El VIH-1, 2 ELISA detecta anticuerpos contra el VIH-1 y / o VIH-2 en suero y plasma. Los estudios clínicos continúan para aclarar y precisar la interpretación y el significado médico de la presencia de anticuerpos al VIH. Para la mayoría de los usos, se recomienda que las muestras repetidamente reactivas sean investigadas mediante pruebas complementarias. Se ha sugerido que las muestras repetidamente reactivas obtenidas a partir de las poblaciones en mayor riesgo y con bajo riesgo de infección por el VIH tienen más probabilidades de demostrar la presencia de anticuerpos contra el VIH con pruebas suplementarias, tales como Western Blot, la inmunofluorescencia o la radioinmuno-precipitación.

La reactividad en o ligeramente por encima del valor de cut-off no es específicamente más frecuente, sobre todo de personas con bajo riesgo de infección de VIH. Una persona que tiene anticuerpos contra el VIH se sospecha que está infectada con el virus y se le debe ofrecer una adecuada asesoría y evaluación médica. Dicha evaluación debe ser considerada como una parte importante de las pruebas de anticuerpos contra el VIH y se deben incluir la confirmación de los resultados del ensayo en una muestra recién extraída.

El SIDA y las enfermedades relacionadas con el SIDA son síndromes clínicos y su diagnóstico sólo puede ser establecido clínicamente por un médico. Las pruebas de ELISA no pueden ser utilizadas solas para diagnosticar el SIDA, incluso si la investigación recomendada de reactivos sugiere una alta probabilidad de que los anticuerpos contra el VIH están presentes. Un resultado negativo en cualquier punto de la investigación de los sujetos individuales no excluye la posibilidad de exposición o infección con el VIH. El riesgo de una persona asintomática con un suero repetible reactivo SIDA en desarrollo o una condición relacionada con el SIDA no se conoce.

**ATLAS MEDICAL**  
**Revisión B (20.10.2010)**