

SD HIV ½ ELISA

Manual de instrução

Explicação do teste

SD HIV ½ ELISA contém uma microplaca pré-revestida com antígenos recombinantes de HIV-1 e HIV-2 (gp41 incluindo subtipo O, p24 e gp 36). Durante a primeira incubação, anticorpos anti-HIV contidos na amostra do paciente (soro ou plasma) se ligam aos antígenos recombinantes da placa. Após esta incubação, todo material que não foi ligado é removido através de lavagem e aspiração. O conjugado enzimático recombinante de antígeno HIV-1 e 2 (gp41 incluindo subtipo O, p24 e gp 36) é ligado ao anti HIV 1-2 da placa formando então um sanduíche. Depois desta incubação, todo material não ligado é removido através de lavagem e aspiração. A atividade enzimática residual encontrada nos poços da microplaca é diretamente proporcional à concentração de anticorpos anti HIV-1 e 2 na amostra do paciente e é evidenciada através da incubação da fase sólida com uma solução cromogênica (TMB) em um substrato tampão. A leitura colorimétrica irá ocorrer através do uso de um espectrofotômetro a 450 nm.

SD HIV ½ ELISA é um duplo sanduíche para detecção qualitativa de anticorpos de todos os isotipos (IgG, IgM e IgA) contra HIV-1 e 2 e é capaz de detectar o subtipo O. Este teste destina-se ao uso profissional e deve ser utilizado como recurso adicional para auxílio no diagnóstico de HIV.

Material fornecido

Material/Reagente	Descrição	Kit para 96T	Kit para 480T
Microplaca	96 poços sensibilizados com antígenos recombinantes de HIV-1 incluindo subtipo O (gp41 e p24) e HIV-2 (gp36). Selada em envelope aluminizado.	1 placa	5 placas
Conjugado enzimático (101x concentrado)	Antígeno recombinante HIV-1 incluindo subtipo O (gp41 e p24) e HIV-2 (gp36) conjugado a HRPO. Conservante: Proclin 300 (0,5%). Nota: Antes de usar, faça uma mistura de 1:100 com conjugado da enzima concentrado e diluente do conjugado.	1 frasco com 0,2 ml	1 frasco com 1 ml
Diluente do Conjugado	Fosfato salino protegido, BSA e estabilizador. Preservativo: Thimerosal (0,01%)	1 frasco com 20 ml	1 frasco com 100 ml
Diluente de amostra	Tampão fosfatado, soro bovino e estabilizador. Pronto	1 frasco com 20 ml	1 frasco com 100 ml

	para uso. Conservante: azida sódica.		
Controle positivo	Soro humano anti Hiv positivo. Conservante: azida sódica. Pronto para uso.	1 frasco com 0,5 ml	1 frasco com 2 ml
Controle negativo	Soro humano anti Hiv negativo. Conservante: azida sódica. Pronto para uso.	1 frasco com 0,5 ml	1 frasco com 2 ml
Substrato (101x concentrado)	Tetrametilbenzidina com amortecedor do citrato-fosfato e DMSO. Nota: Antes de usar, faça a mistura de 1:100 com substrato concentrado e o diluente de substrato em tubo de vidro.	1 frasco com 0,2 ml.	1 frasco com 1 ml.
Diluente de Substrato	Solução citrato-fosfato e água oxigenada.	1 frasco com 20 ml.	1 frasco com 100 ml.
Solução de lavagem concentrada	PBS-Tween 20. Conservante: Proclin 300 (0,05%). Nota: antes de usar, misture 50 ml do concentrado da lavagem com 1.000 ml de água destilada. Em caso de estarem presentes cristais, re-suspender a solução deixando a mesma em 37 graus Celsius por alguns minutos.	1 frasco com 50 ml.	2 frascos com 100 ml.
Solução de parada	Ácido sulfúrico 1,6 N. Pronto para uso.	1 frasco com 20 ml.	1 frasco com 100 ml.
Adesivo selador para placa			
Instruções de uso			

Precauções

A fim de obter resultados reprodutíveis, as regras abaixo devem ser seguidas:

- Apenas para uso diagnóstico in vitro.
- Não misturar reagentes de diferentes lotes.
- Utilize óculos de proteção, a fim de evitar a contaminação por metais, íons e/ou substâncias oxidativas.
- Utilize luvas enquanto manuseia materiais potencialmente infectantes e durante o ensaio.
- O substrato e solução de parada devem ser manuseados com cuidado. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. Em caso de acidentes, lave a região abundantemente com água corrente.
- Utilizar sempre as boas práticas de laboratório.

Coleta, preparo e armazenagem das amostras

As amostras utilizadas para a realização deste teste podem ser soro ou plasma humanos.

Procedimento para coleta e preparo das amostras:

- Coletar sangue total por venipunção.
- Centrifugar o sangue total para obter o plasma ou soro.
- Se a amostra não for utilizada imediatamente, esta deve ser refrigerada entre 2 a 8 graus Celsius. Para períodos de armazenagem superiores há três dias, o congelamento da amostra é recomendado. Neste caso, deixe que a amostra atinja temperatura ambiente antes da realização do teste.
- Amostras com precipitado podem causar resultados inconsistentes. Estas amostras devem ser clarificadas antes do uso das mesmas.

Preparo dos reagentes

- Conjugado enzimático: 1:100 com conjugado da enzima concentrado e diluente do conjugado.
- Substrato: 1:100 com substrato concentrado e o diluente de substrato em tubo de vidro.
- Solução de lavagem: dilua todo o conteúdo da solução de lavagem (50 ml) em 1000 ml (1L) de água destilada. Em caso de estarem presentes cristais, re-suspender a solução deixando a mesma em 37 graus Celsius por alguns minutos.

Realização do teste

- Prepare 3 poços da microplaca para a realização de controle negativo e mais dois poços para a realização de controle positivo. Prepare os poços das amostras.
- Pipetar 100 ul de diluente de amostra em cada poço.
- Adicionar 50 ul de controle negativo em cada um dos 3 poços destinados ao controle negativo; 50 ul de controle positivo nos 2 poços destinados ao controle positivo e 50 ul de amostra nos poços destinados à realização dos testes.
- Cubra a microplaca com selo adesivo e homogenize a mesma gentilmente por 20 a 30 segundos.
- Incubar a microplaca a 37 graus Celsius durante 60 minutos.
- Lavar os poços 5 vezes com 350 ul de solução de lavagem previamente preparada, deixando que a solução de lavagem permaneça em contato com os poços por pelo menos 10 segundos.
- OBS: a etapa de lavagem é fundamental para o bom desempenho do teste. Realize cuidadosamente de acordo com as instruções acima.
- Pipetar 100 ul de conjugado enzimático preparado em cada poço.
- Cobrir a placa com o selo adesivo.
- Incubar por 37 graus Celsius por 30 minutos.
- Lavar os poços com solução de lavagem previamente preparada por 5 vezes. Adicione 350 ul de solução de lavagem, deixe que a mesma permaneça em contato com o poço por pelo menos 10 segundos e então aspire ao conteúdo do poço.
- Adicione 100 ul de solução TMB previamente preparada em cada poço.
- Incubar os poços por 30 minutos em temperatura ambiente.
- Pipetar 100 ul de solução de parada em cada poço.
- Ler a absorbância dos poços com um espectrofotômetro bicromático a 450nm com referência 620nm. A leitura deve estar completa até 1 hora depois do término do ensaio.

Interpretação dos resultados

Validação do teste

Os valores individuais de absorbância para o soro controle podem ser utilizados se possuírem os seguintes valores:
 Controle negativo: o valor deve ser maior ou igual a -0,010 e menor ou igual a 0,200
 Controle positivo: maior ou igual a 1,000,00.
 Se uma das absorbâncias do controle negativo estiver fora das especificações, este valor não deve ser usado para a interpretação dos

resultados (rejeitado). Ambos os valores do controle positivo devem estar dentro das especificações. Se os valores não estiverem dentro das especificações, o teste deve ser refeito.

Avaliação

Calcular a média de absorbância dos controles negativos, e então calcular o valor do cut-off adicionando 0,300 a esta média obtida:

A (média dos controles negativos)+0,300= valor cut-off

As amostras então devem ser classificadas da seguinte maneira:

Valor ABS amostra menor Valor cut-off= anti HIV ½ negativo

Valor ABS amostra maior Valor cut-off= anti HIV ½ positivo

Amostras com valores iguais ou semelhantes ao valor do cut-off devem ser re-testadas em duplicata. Se no re-teste os valores continuarem iguais ou semelhantes ao cut-off, a amostra deve ser submetida a um teste confirmatório.

Limitações e interferências

- O procedimento do teste, precauções e interpretação dos resultados deve ser seguido estritamente como descrito nesta bula.

Amostras

- Amostras contendo azida sódica não afetam os resultados.

- Amostras pasteurizadas (não menos que 10 horas a 60 graus Celsius) podem ter suas propriedades diminuídas, não devendo ser utilizadas.

- Amostras inativadas (1 hora a 56 graus Celsius) não afetam os resultados dos testes. Anticoagulantes como heparina, citrato e EDTA não interferem nos resultados dos testes.

- Amostras hemolíticas devem ser centrifugadas antes do uso para evitar interferências por constituintes celulares.

- Fatores reumatóides presentes podem elevar a atividade das amostras.

- Amostras lipêmicas e ictericas não afetam os resultados dos testes.

Este teste detecta anticorpos antivírus da imunodeficiência humana em soro ou plasma, e deve ser utilizado como procedimento de triagem. A falha em adicionar amostras e/ou no procedimento ocasionada por diversos motivos pode causar resultados falso-negativos. A repetição do teste deve ser considerada quando há evidências clínicas de infecção.

Armazenagem e estabilidade

O SD HIV 1/2 ELISA deve ser armazenado entre 2 a 8 graus Celsius. O kit é válido até a data impressa na embalagem e no rótulo de cada componente quando fechado em sua embalagem original.

Estabilidade dos reagentes após abertos

Reagente		Armazenagem	Estabilidade
Microplaca	Depois de aberta	2 a 8 graus, selada	1 mês
Dilúente de amostra	Depois de aberto	2 a 8 graus Celsius	3 meses
Conjugado enzimático	Depois de aberto	2 a 8 graus Celsius	3 meses
Conjugado enzimático (preparado)	Diluído 1:101	Temperatura ambiente	2 horas
Controle negativo	Depois de aberto	2 a 8 graus Celsius	3 meses
Controle positivo	Depois de aberto	2 a 8 graus Celsius	3 meses
Substrato (preparado)	Diluído 1:101	Temperatura ambiente, fechado e protegido da luz	4 horas
Dilúente do	Depois de	2 a 8 graus	Data de

Substrato	aberto	Celsius, fechada, protegido da luz	validade
Solução de lavagem conc.	Depois de aberto	2 a 8 graus Celsius	Data de validade
Solução de lavagem reconstituída	Diluída 1:20 em água destilada	2 a 8 graus Celsius Temperatura ambiente	3 meses 2 semanas
Solução de parada	Depois de aberta	Temperatura ambiente	Data de validade

Características da performance

SD HIV ½ ELISA foi testado com amostras clínicas positivas e negativas e teve seus resultados comparados a um kit líder de mercado (kit para detecção de anticorpos anti HIV1/2). Os resultados demonstraram que o SD HIV ½ ELISA possui ótima performance.

Referência				
Método	Resultados	Positivo	Negativo	Resultados totais
ELISA comercial	Positivo	187	0	187
	Negativo	1	511	512
Resultados totais		188	511	699

Sensibilidade relativa: 100%

Especificidade relativa: 99,8%

Precisão

As precisões intra-ensaio e entre-ensaio foram determinadas através do testes de 10 replicatas de 3 amostras: uma negativa, uma positiva baixa e outra positiva alta. O coeficiente de variação (CV5) da negativa, positiva baixa e positiva alta foram de 10%.

Bibliografia e leitura sugerida

- 1) M.S. Saac, M.Holodniy, D.R. Kuritzhes, etc.: HIV viral load markers in clinical practice. Nature Medicine, Volume 2, Number 6, June 1996.
- 2) Eve M. Lackritz, M.D., Glen A. Satten, Ph.D, etc.: Estimated risk of transmission of the Human Immunodeficiency Virus by Screened Blood in the United States. Journal of Medicine, Volume 333, Number 26.
- 3) Lee Ratner, William Haseltine, Roberto Patarca, etc.: Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature VOL. 313, 24 January 1985.
- 4) V.S. Ivanov, Z.K. Suvorova, L.D. Tchikin, A.T. Kozhich and V.T. Ivanov : Effective method for synthetic peptide immobilization that increases the sensitivity and specificity of ELISA procedures. Journal of Immunological Methods, 153 (1992) 229-233.
- 5) Mi Jin Sohn, Young Hae Chong, Ji Eun Chang, Young Ik Lee : Overexpression and simple purification of human immunodeficiency virus-1 gag epitope derived from a recombinant antigen in E. coli and its use in ELISA. Journal of Biotechnology 34 (1994) 149-155.

Produzido por:

STANDARD DIAGNOSTICS INC.

34, Pajang-dong , Jangan-ku, Suwon-si

Kyonggi-do

Coréia

<http://www.standardia.com>

Importado e distribuído por:

RZ DE OLIVEIRA DIAGNÓSTICA - EPP

Rua Campevas, 627

CEP.05016-010 - São Paulo - SP

CNPJ 05.328.040/0001-80

Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA 80313040033

Téc. Resp. Dra. Renata Zuculin de Oliveira - CRF-SP 37986

POTENCIALMENTE INFECTANTE

CONSERVAR A TEMPERATURA 2°C A 8°C

PARA DESCARTE, CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Quaisquer dúvidas técnicas no manuseio deste kit ou no seu procedimento, contatar a nossa **ASSESSORIA CIENTÍFICA**.

Atendimento ao consumidor - Fone (011)-3871-0095