

FINALIDADE

O Kit BIOLISA HIV 1/2/O é um imunoenensaio de terceira geração para a detecção qualitativa da presença de anticorpos totais (IgG, IgM e IgA) ao HIV-1, HIV-2, e / ou subtipo O em amostras de soro ou plasma humano. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoenensaio ou imunoenzimétrica.

O Kit BIOLISA HIV 1/2/O é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio "sanduíche" para a detecção de anticorpos totais (IgG, IgM e IgA) para HIV-1, HIV-2, e/ou subtipo O em soro humano ou plasma. A microplaca é revestida com antígenos HIV recombinantes específicos para HIV-1(p24, gp 41), HIV-2 (gp36) e subtipo O.

Anticorpos contra o HIV-1, HIV-2, e/ou subtipo O presentes nas amostras se ligam aos antígenos HIV recombinantes revestidos na microplaca formando complexos antígenos - anticorpos HIV. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover materiais não ligados. As enzimas conjugadas com antígenos recombinantes do HIV são adicionadas à microplaca e então incubadas. A enzima conjugada com antígenos recombinantes do HIV liga-se aos complexos imobilizados antígeno-anticorpo HIV presentes. Após esta etapa, os substratos A e B são adicionados e incubados, produzindo uma cor azul que indica a quantidade de anticorpos HIV presentes nas amostras. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

REAGENTES

1. Placa Sensibilizada

Microplaca revestida com antígenos recombinantes HIV.

2. Conjugado

Antígenos recombinantes HIV ligados à peroxidase; conservante. Estocar entre 2 e 8°C.

3. Lavagem Concentrada (50x)

Solução tampão, surfactante e conservante.

4. Substrato A

Solução tampão contendo peróxido de hidrogênio; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

5. Substrato B

Tampão contendo tetrametilbenzidina (TMB); conservante.

6. Solução de Parada

Ácido clorídrico 1M

7. Controle Negativo

Solução não reativa para HBsAg, HCV, HIV-1 e HIV-2; conservante.

8. Controle Positivo HIV-1N

Solução contendo HIV-1 e negativo para HIV-2,HCV, HBsAg; conservante.

9. Controle Positivo HIV-2

Solução contendo HIV-2 e negativo para HIV-1, HCV, HBsAg; conservante.

10. Seladores de Placa

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa sensibilizada	1 Unidade 96 cavidades	2 Unidades 96 cavidades	5 Unidades 96 cavidades
2- Conjugado	1 Frasco X 12 mL	2 Frascos X 12 mL	5 Frascos X 12 mL
3-Lavagem Concentrada	1 Frasco X 20 mL	2 Frascos X 20 mL	4 Frascos X 20 mL
4- Substrato A	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
5- Substrato B	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
6- Solução de Parada	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
7- Controle Negativo	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
8- Controle Positivo HIV-1N	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
9- Controle Positivo HIV-2	1 Frasco X 1 mL	2 Frasco X 1 mL	4 Frasco X 1 mL
10- Seladores de Placa	3 unidades	5 unidades	10 unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos nos Kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 50 e 100µL com precisão maior que 1,5%.
- 2- Repipetadores para pipetagens repetitivas de volumes de 100µL e 300µL, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 e 630nm de comprimento de onda.
- 5- Pipetas com volumes reguláveis (200µL a 1000µL) para preparação do Substrato.
- 6- Tubos de ensaio para a preparação dos substratos A e B.
- 7-Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8- Cronômetro ou relógio.
- 9- Frasco para estocar a solução de lavagem, após diluída.
- 10- Água destilada ou deionizada.
- 11- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 12- Incubadora de 37°C ± 2°C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. **Não congelar.** Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3 - O envelope contendo as tiras deve ser aberto somente após atingirem a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2-8°C;
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;
- 5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;

6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente;

7 - Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos;

8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades;

9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina;

10 - Assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio;

11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de hipoclorito durante armazenamento ou etapas de incubação;

12-A Solução de Parada contém ácido clorídrico, que é um ácido forte. Portanto, manuseie-o com o devido cuidado.

AMOSTRAS

Utilizar soro ou plasma (EDTA ou Heparina).

Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer). Para amostras que serão testadas em duplicata, o volume requerido é de 0,010mL de soro/ plasma.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de Lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco nº 3 (Lavagem Concentrada) em 1000mL de água destilada ou deionizada. Estocar entre 2 e 8° C até a data de validade impressa no frasco original. Pode ser armazenada em temperatura ambiente.

Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

2) Substrato – Solução de Trabalho

Determinar a quantidade de cavidades que serão utilizadas para preparo de um volume adequado.

Preparar a solução misturando partes iguais de Substrato A e Substrato B, 15 minutos antes de sua utilização.

Mantenha-o protegido da luz até ser utilizado.

Para cada microcavidade (teste), utilizar:

50µL de Substrato A + 50µL de Substrato B

Por exemplo: misture 1mL de Substrato A e 1mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes). Ocorre sobra de reagente

TÉCNICA

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os Reagentes, Amostras e Controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30°C) por no mínimo 40 minutos.

Retornar as tiras da microplaca que não serão utilizadas para a embalagem original.

1-Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras. (podendo ser testados em duplicata).

2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).

3- Pipetar 100µL de Controle Negativo, Controle Positivo HIV-1N, Controle Positivo HIV-2 e Amostras nas respectivas cavidades.

4- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

5-Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.

6-Retirar o selador de placa das cavidades.

7-Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (manual);

Usar 300µL aproximadamente de Solução de Lavagem previamente preparada*, para efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

Nota: Lavagem/ secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

8- Pipetar 100µL de Conjugado em cada cavidade exceto na cavidade do branco (Se tiver feito a opção).

9- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

10-Incubar por 20 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.

11-Retirar o selador de placa das cavidades.

12- Repetir o item 7.

13-ATENÇÃO Siga um dos seguintes procedimentos:

A) Pipetar 100µL de Substrato previamente preparado* – Solução de trabalho (A+ B) em cada cavidade. *Vide PREPARO DE REAGENTES.

Ou

B) Pipetar 50µL de Substrato A e 50µL de Substrato B em cada cavidade.

14- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

15-Incubar por 10 minutos ± 1 minuto em uma incubadora a 37°C ± 2°C.

16-Retirar o selador da placa das cavidades.

17-Pipetar 50µL de Solução de Parada em cada cavidade.

18- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

19-Ler a 450nm (filtro primário) / 630 nm (filtro secundário) até 30 minutos no máximo.

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura dos Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	Requisitos de Validação
Cavidade Branco	<0,050
Controle Negativo	<0,100
Controle Positivo HIV-1N / HIV-2	>0,500

As absorvâncias para os controles acima foram obtidas após a diminuição da absorvância do branco. Para leitura em filtro único (450 nm) considerar limite de branco < 0,100.

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

QUALITATIVO

Calcular a absorbância média do Controle Negativo.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Controle Negativo	A1=0,020
	A2=0,018
Absorbância média do Controle Negativo	$(0,020 + 0,018) / 2 = 0,019$

Se os Resultados dos Controles Forem Válidos, **calcule** o Cut-Off com a seguinte fórmula.
Exemplo

ITEM	ABSORBANCIA
CUT-OFF= Absorbância média do Controle Negativo + 0,160	$0,019 + 0,160 = 0,179$

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de cut-off.
Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Amostra	1,320
Valor de Cut-off	0,179
Índice: Amostra / Valor de Cut-Off	$1,320 / 0,179 = 7,37$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADOS	QUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	$\geq 0,9$ e $\leq 1,1$

NÃO REATIVA: * Amostra com absorbância menor que o Cut-Off é considerada não-reativa para anticorpos do HIV-1, HIV-2, e / ou subtipo O e pode ser considerada negativa.

REATIVA: * Amostra com absorbância superior ao Cut-Off é considerada inicialmente reativa para anticorpos do HIV-1, HIV-2, e / ou subtipo O. A amostra deve ser reanalisada em duplicata antes do final da interpretação. A amostra que for reativa em pelo menos uma das reanálises, se presume ser reativa e deve ser confirmada através de método confirmatório IFI e/ou Western Blot.

Observação: * No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada em duplicata. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação, antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Enfim, todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve estabelecer valores de referência para os controles em níveis baixo, normal e elevado para monitorar a performance do teste.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Exatidão

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O Kit BIOLISA HIV 1/2/O analisou amostras clínicas (soro conversão) em comparação com outro método de EIA. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do Kit BIOLISA - HIV 1/2/O é >99,9%, e a especificidade clínica é de 99,8%.

HIV 1/2/O EIA x EIA REFERÊNCIA

MÉTODO	EIA REFERÊNCIA		TOTAL	
	RESULTADO	POSITIVO		NEGATIVO
BIOLISA HIV 1/2/O	POSITIVO	74	2	76
	NEGATIVO	0	1043	1043
RESULTADO TOTAL		74	1045	1119

Sensibilidade Clínica: >99,9% (95,1 - 100,0%) *
Concordância global: 99,8% (99,4 - 100,0) * Especificidade Clínica: 99,8% (99,3 - 100,0%) *
*95% Intervalo de confiança

Precisão

REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Repetibilidade		
	1	2	3
Média	0,731	1,563	2,258
Desvio padrão	0,005	0,012	0,010
Coefficiente de variação (%)	0,689	0,776	0,444

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens durante 3 dias consecutivos com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Reprodutibilidade		
	1	2	3
Média	0,730	1,556	2,247
Desvio padrão	0,056	0,079	0,077
Coefficiente de variação (%)	7,672	5,071	3,428

SIGNIFICADO CLÍNICO

HIV é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). As principais vias de transmissão incluem a exposição a sangue e hemoderivados, incluindo a partilha de agulhas e seringas, contato sexual e transmissão de mãe para filho. O vírus é cercado por um envelope lipídico que é derivado da membrana da célula hospedeira. Várias glicoproteínas virais estão no envelope. Cada vírus contém duas cópias de RNA genômico. O HIV-1 foi isolado de pacientes com AIDS, e de pessoas saudáveis com alto potencial de risco para o desenvolvimento da AIDS. O HIV-1 consiste em subtipo M e subtipo O. Cepas altamente divergentes do HIV-1 foram reconhecidas em 1990 e agrupadas provisoriamente como subtipo O, pois esta variação era semelhante aos marcadores de glicoproteína do HIV-1, mas com uma ligeira variação para o marcador de proteína. Embora raramente comparado para HIV-1 e HIV-2, infecções causadas por Subtipo O até agora têm sido identificadas na África (Camarões), França e Alemanha. O HIV-2 foi isolado de pacientes com AIDS e indivíduos soropositivos assintomáticos no Oeste Africano. O HIV-1, HIV-2, e o Subtipo O, induzem resposta imune. A detecção de anticorpos anti-HIV no soro, plasma ou sangue total é mais eficiente e uma forma comum de determinar se um indivíduo foi exposto ao HIV. Apesar das diferenças em suas características biológicas, atividades sorológicas e seqüências de genoma, o HIV-1, HIV-2 e subtipo O mostram forte reatividade cruzada antigênica. A maioria dos soros positivos HIV-2 podem ser identificados por meio de testes sorológicos com HIV-1. O teste utiliza antígenos recombinantes do HIV para detectar seletivamente anticorpos do HIV-1, HIV-2 e / ou subtipo O em soro ou plasma.

NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 – 96 testes
Apresentação 2 – 192 testes
Apresentação 3 – 480 testes

BIBLIOGRAFIA

- Chang, SY, Bowman, BH, Weiss, JB, Garcia, RE and White, TJ. The origin of HIV-1 isolate HTLV-IIIB. Nature (1993) 3:363:466-9.
- Arya, SK, Beaver, B, Jagodzinski, L, Ensoji, B, Kanki, PJ, Albert, J, Fenyo, EM, Biberfeld, G, Zagury, JF and Laure, F. New human and simian HIV-related retroviruses possess functional transactivator (tat) gene. Nature (1987) 328:548-550.
- Caetano JA Immunologic aspects of HIV infection. Acta Med Port (1991) 4 Suppl 1:52S-58S.
- Janssen, RS, Satten, GA, Stramer, SL, Rawal, BD, O'Brien, TR, Weiblen, BJ, Hecht, FM, Jack, N, Cleghorn, FR, Kahn, JO, Chesney, MA and Busch MP. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. JAMA (1998) 280(1):42-48.
- Travers, K, Mboup, S, Marlink, R, Gueye-Nidaye, A, Siby, T, Thior, I, Traore, I, Dieng-Sarr, A, Sankale, JL and Mullins, C. Natural protection against HIV-1 infection provided by HIV-2. Science (1995) 268:1612-161.
- Greenberg, AE, Wiktor, SZ, DeCock, KM, Smith, P, Jaffe HW and Dondero, TJ, Jr. HIV-2 and natural protection against HIV-1 infection. Science (1996) 272:1959-1960.
- Bioclin – Dados de arquivos

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455
e-mail bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 031 5454.
e-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do Kit Biolisa HIV 1/2/O na ANVISA: 10269360200

Revisão: Junho/ 2011