

HIV 1+2+0 Ag/Ab 4ta Generación

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la detección cualitativa in vitro (ligado a enzimas) del VIH-1 Antígeno P24 y anticuerpos (incluidos del Grupo O) contra el virus de la inmunodeficiencia humana en suero o plasma humanos.

Resumen:

Los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 son los agentes etiológicos de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y condiciones relacionadas. El VIH se ha aislado de pacientes con SIDA, complejo relacionado con el SIDA (ARC) y de individuos sanos con alto riesgo de SIDA. La infección por el VIH va seguida de una enfermedad aguda parecida a la gripe. Esta fase puede pasar desapercibida y la relación con la infección por el VIH puede no estar clara en muchos casos. La fase aguda es seguida típicamente por un estado de portador asintomático, que progresa a SIDA clínico en aproximadamente el 50% de los infectados individuos dentro de los 10 años posteriores a la seroconversión. La evidencia serológica de la infección por el VIH puede obtenerse mediante pruebas para la presencia de antígenos o anticuerpos del VIH en el suero de personas sospechosas de infección por el VIH. Los antígenos generalmente pueden detectarse durante la fase aguda y la fase sintomática del SIDA solamente. Los anticuerpos contra el VIH-1 y/o el VIH-2 puede detectarse prácticamente durante todo el período de infección, comenzando en la fase aguda o poco después y durando hasta la etapa final del SIDA. Aparte de la transmisión sexual, la principal vía de infección por el VIH es la transfusión de sangre. El VIH puede presentarse tanto en fracciones celulares como libres de células de la sangre humana. Por lo tanto, en todas las donaciones de sangre o plasma debe hacerse la prueba debido al riesgo de transmisión del VIH a través de sangre contaminada. Las pruebas ELISA para la detección de la infección por VIH se caracteriza por una alta sensibilidad, especificidad y un procedimiento de operación simple. Desde que se comercializaron las primeras pruebas ELISA de VIH introducido en 1985, se han desarrollado cuatro generaciones más. Las pruebas de primera generación se basaron en lisado viral antígenos derivados de virus que se cultivan en líneas de linfocitos T humanos. La presencia de trazas de célula huésped. Componentes en los que se han propagado los viriones podría dar lugar a contaminación cruzada y, por tanto, a tasas muy elevadas de resultados falsos positivos. Con la clonación del genoma del VIH, mejores ensayos basados en proteínas recombinantes y/o Los péptidos sintéticos (conocidos como de segunda generación) estuvieron rápidamente disponibles. La utilización de métodos biotecnológicos permite predominantemente la expresión de las importantes regiones inmunoreactivas de las proteínas y también permitió la producción de ensayos combinados de VIH-1/VIH-2. El antígeno recombinante también podría producirse con una cantidad considerablemente de mayor pureza y en grandes cantidades, y pueden unirse a la superficie de la fase sólida con un control mucho más estricto sobre las proporciones de proteínas y concentraciones. Los kits de VIH de primera y segunda generación se basaron en el método ELISA indirecto y podían detectar Anticuerpos IgG solo por anticuerpos IgG antihumanos marcados con enzimas. El ELISA de tercera generación utilizó doble antígeno: método sándwich: nuevamente con antígenos recubiertos en placas de poliestireno en fase sólida, pero con anticuerpos detección lograda con la ayuda de otro antígeno marcado con enzima. El ensayo de tercera generación podría detectar todos anticuerpos en la muestra (IgG, IgM, etc.), lo que aumenta significativamente la sensibilidad del ensayo en comparación con las anteriores generaciones, además, la detección de anticuerpos IgM que están presentes solo durante las primeras etapas de la infección, acorta mucho el "período de ventana" de detección de anticuerpos (el período de tiempo en el que no hay anticuerpos detectables) y en comparación con la segunda generación, las pruebas de sándwich podrían detectar anticuerpos 11 días antes. A reducir aún más el período de ventana de detección de anticuerpos, los kits de ELISA de VIH de cuarta generación podrían simultáneamente detectar antígenos (p24) y anticuerpos del VIH y todos los subtipos, incluidos los comunes. Las formas circulatorias recombinantes (CRF) están disponibles comercialmente desde 1998. Con la detección de p24, la cuarta generación las pruebas acortan el "período de ventana" a 16 días, o en comparación con la tercera generación, la infección por VIH podría detectarse 8 días antes

Principio de la Prueba:

El inmunoensayo utiliza el "principio de sándwich", ligado a enzimas. Ensayo inmunológico de adsorción., de incubación en dos pasos, que utiliza pocillos de poliestireno recubiertos previamente con antígenos de VIH recombinantes (VIH-1 recombinante gp41, gp120, recombinante gp36 del VIH-2 y antígeno del péptido del grupo O) y anticuerpos anti-VIH (p24). Como primer paso, los anti-VIH biotinilados (p24) los anticuerpos junto con la muestra de suero o plasma del paciente se agregan a los pocillos. Durante la incubación, los anticuerpos específicos contra el VIH-1/2, si están presentes en la muestra, se capturarán dentro de los pocillos. Simultáneamente, si el antígeno VIH p24 está presente en la muestra, también se capturará como un complejo sándwich de doble anticuerpo que consta de los anticuerpos recubiertos-p24-anticuerpos biotinilados. Luego, los micropocillos se lavan para eliminar el suero no unido. La detección de proteínas del complejo de anticuerpo biotinilado-antígeno p24 del VIH capturado o de los anticuerpos del VIH-1/2 es lograda durante el segundo paso de incubación mediante la adición de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), se ha conjugado con segundos antígenos recombinantes de VIH 1+2 y con avidina. La detección de P24: cuando se ha capturado p24 dentro de los pocillos, la avidina reaccionará con la biotina y unirá HRP al complejo Ab-p24-Ab. La detección de anticuerpos contra el VIH-1/2: cuando se han capturado anticuerpos contra el VIH-1/2 dentro de los pocillos, los antígenos conjugados con HRP se unirán a los anticuerpos capturados formando Ag-Ab-Ag (HRP) — sándwich inmunocomplejo.

Los micropocillos se lavan para eliminar el conjugado no unido y se agregan soluciones de cromógeno a los pocillos. En pocillos que contienen los inmunocomplejos Ag-Ab-Ag (HRP) y/o Ab-p24-Ab (HRP) — sándwich II, los cromógenos incoloros son hidrolizados por el HRP unido a un producto de color azul. El color azul se vuelve amarillo. después de detener la reacción con ácido sulfúrico. La cantidad de intensidad de color se puede medir y es proporcional a la cantidad de anticuerpos o p24 capturados en los pocillos en las muestras respectivas. Los pocillos que contienen las muestras negativas para anti-HIV-1/2 o

p24 permanecen incoloros. Lo que se puede medir en este punto es la cantidad de intensidad de color proporcional a la cantidad de anticuerpo capturado en los pocillos y a la muestra. Los pocillos incoloros indican negativo para anti-VIH 1/2.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos, recubierta previamente antígenos recombinantes de VIH1+2 y anticuerpos anti-VIH (p24).
- Control negativo, 1 vial de 1.5 ml. Contiene de conservante ProClin300. Listo para usar. Tampón estabilizado con proteínas probado como no reactivo para anticuerpos HIV1+2. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Control Positivo HIV-1, 1 vial de 1.5 ml. Contiene de conservante ProClin300. Anticuerpos anti-VIH-1 diluidos en tampón estabilizado con proteínas. Listo para usar. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Control Positivo HIV-2, 1 vial de 1.5 ml. Contiene de conservante ProClin300. Anticuerpos anti-VIH-2 diluidos en tampón estabilizado con proteínas. Listo para usar. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Control Positivo Antígeno P24, 1 vial de 1.5 ml. Contiene de conservante ProClin300. Antígeno P24 del VIH diluido en tampón estabilizado con proteínas. Listo para usar. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Conjugado enzimático 1, 1 vial de 3 ml. Contiene de conservante ProClin300. Etiquetado anticuerpos anti-HIV P24 biotinilados conjugados. Listo para usar. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Conjugado enzimático 2, 1 vial de 12 ml. Contiene de conservante ProClin300. Etiquetado anticuerpos anti-HIV 1+2. recombinantes conjugados con peroxidasa de rábano picante y avidina marcada con HRP. Listo para usar. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Concentrado de solución de lavado, 1 envase de 40 ml (concentrado 20X), Contiene Tween-20. El concentrado debe diluirse de 1 a 19 con agua destilada/desionizada. Una vez diluido, estable durante una semana a temperatura ambiente, o durante dos semanas si se almacena a 2-8 °C.
- Sustrato A, 1 vial de 6 ml. Contiene solución de peróxido de urea. Listo para usar. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Sustrato B, 1 vial de 6 ml. Contiene solución de tetrametil bendicina (TMB). Listo para usar. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Solución de parada, 1 vial de 6 ml. Contiene solución de ácido sulfúrico diluido (0.5M H₂SO₄). Listo para usar como se suministra. Una vez abierto, estable durante un mes a 2-8°C.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 630 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas que suministran 50 µl con una precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

Precauciones y Advertencias:

- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos 5 veces por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado. Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo. Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua. Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- La humedad atmosférica en placas frías reduce significativamente su vida útil.
- Usar el pozo en blanco para corregir el cero punto de lectura si se utiliza un lector de longitud de onda única. Si los lectores de doble longitud de onda con 450nm y 630nm son usados, no hay necesidad de corregir el punto cero.

ADVERTENCIA: Es posible que se hayan utilizado materiales de origen humano en la preparación del Control Negativo del kit. Estos materiales han sido probados con kits de prueba con rendimiento aceptado y resultaron negativos para anticuerpos contra VIH 1/2, VHC, TP y HBsAg. Sin embargo, no existe un método analítico que pueda asegurar que los agentes infecciosos en las muestras o reactivos están completamente ausentes. Por lo tanto, manipule los reactivos y las muestras con extrema precaución como si fuera capaz de transmitir enfermedades infecciosas.

Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C. Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regréselo a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los controles no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

Recolección y Preparación de Muestras:

- La Recolección de muestras no requiere preparación especial del paciente. Recoger la muestra de acuerdo con las prácticas normales de laboratorio. Con este ensayo se pueden utilizar muestras frescas de suero o plasma. Sangre recolectada por punción venosa se debe permitir que se coagule de forma natural y completa; el suero/plasma se debe separar de el coágulo lo antes posible para evitar la hemólisis de los glóbulos rojos. Se debe tener cuidado para asegurar que los sueros de las muestras sean transparentes y no están contaminadas por microorganismos. Cualquier materia particulada visible en la muestra debe ser removido por centrifugación a 3000 RPM por 20 minutos a temperatura ambiente o por filtración.
- Las muestras de plasma recolectadas en EDTA, citrato de sodio o heparina pueden analizarse, pero muestras altamente hemolíticas, lipémicas o ictericas no se deben utilizar ya que pueden dar falsos resultados.
- No inactivar con calor especímenes. Esto puede provocar el deterioro del analito objetivo.
- Muestras con contaminación microbiana visible nunca debe usarse.
- No utilice el ensayo para análisis de muestras de cadáveres, saliva, orina u otros fluidos corporales, o sangre acumulada (mezclada).
- Transporte y almacene las muestras a 2-8°C. Muestras no requeridas para el ensayo dentro de los 7 días debe almacenarse congelado (-20°C o menos). Deben evitarse los ciclos múltiples de congelación y descongelación.

Control de Calidad y Cálculos de Resultados:

Cada microplaca debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo, independientemente del número de placas procesadas simultáneamente. Los resultados se calculan relacionando cada valor de absorbancia (A) de muestra al valor de corte (C.O.) de la placa. Si la lectura de corte se basa en un lector de placa de filtro único, los resultados deben calcularse restando el valor del pocillo blanco a los valores del resultado de las muestras y control. En caso de que la lectura se base en un lector de placa de doble filtro, no reste el valor del pocillo blanco al resultado. Informar valores de muestras y controles.

Cálculo del valor de corte (C.O.) = $0,1 + NC$ (NC = el valor medio de absorbancia para dos controles negativos).

Control de Calidad (validación de la prueba): Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de control de calidad. Es recomienda que cada laboratorio debe establecer un sistema de control de calidad apropiado con material de control de calidad similar o idéntico a la muestra del paciente que se analiza.

- El valor del pocillo del blanco, que contiene solo cromógeno y solución de parada, es $< 0,080$ a 450 nm.
- Los valores del Control positivo deben ser $\geq 0,800$ a 450/630nm o a 450nm después del blanco.
- Los valores del Control Negativo deben ser $< 0,100$ a 450/630nm o a 450nm después del blanco.

Si uno de los valores del control negativo no cumple con los criterios de control de calidad, debe descartarse y la media del valor calculando de nuevo utilizando el valor restante. Si más de un valor del control negativo no cumple con los requisitos de calidad de las especificaciones del rango de control, la prueba no es válida y debe repetirse.

Ejemplo:

1. Control de Calidad

Valor del Blanco: $A1 = 0,025$ a 450nm (Nota: Blanco requerido solo cuando se usa solo el filtro de 450nm)

Pocillo No.:

	B1			C1		
	D1	E1	F1	G1	H1	A2
Valores de control negativo A después del blanco:				0,022		0,024
Número de pozo:						
Valores de control positivo A después del blanco:	2,118	2,109	2,115	2,116	2,107	2,109

Todos los valores de control están dentro del rango de control de calidad establecido.

2. Cálculo de CN: = $\frac{0,022+0,024}{2} = 0,023$

3. Cálculo del Corte (Cut-off): (C.O.) = $0,1 + 0,023 = 0,123$

Solución de Lavado (Dilución 20X):

Diluya 50 ml de Solución de Lavado Concentrada en 950 ml de agua desionizada, para un volumen final de 1000 ml. Estable por 1 semana temperatura ambiente o dos semanas a 2°C - 8°C.

Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada control y muestra a realizar. Todos los controles y muestras se deben establecer por duplicado.
- Agregue 75 µL de control positivo, control negativo y muestras a cada pocillo excepto el pocillo del blanco.
- Agregue 25 µL del conjugado 1 a cada pocillo excepto el blanco.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incuba a 37°C durante 60 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µl de solución de lavado, de 30 a 60 segundos por cada lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.
- Agregue 100 µL del conjugado 2 a cada pocillo excepto el blanco.
- Cubra la placa con la tapa placa e incuba a 37°C durante 30 minutos.
- Agregue 350 µl de solución de lavado, de 30 a 60 segundos por cada lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.

- Agregue 50 µL del Sustrato A y 50 µL del sustrato B a cada pocillo incluyendo el pocillo del blanco.
- Cubra la placa con la tapa placa e incuba a 37°C durante 30 minutos evitando la luz. La reacción enzimática entre las soluciones de Sustrato y el Conjugado produce un color azul en los controles positivos y en los pocillos de muestra VIH positivos.
- Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
- Agite de 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pozo dentro de los primeros 10 minutos a 450nm (usando 620 a 630nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.

Interpretación de Resultados:

Resultados Negativos: Valor de DO de la Muestra < C.O.

Las muestras que arrojan una absorbancia inferior al valor de corte son negativas para esta prueba, lo que indica que no se ha detectado VIH con este método de ELISA. Por lo tanto, es probable que el paciente no esté infectado con VIH.

Resultados Positivos: Valor de D.O. de la Muestra \geq C.O.

Las muestras que dan una absorbancia igual o mayor que el valor de corte son considerado inicialmente reactivo, lo que indica que los anticuerpos del VIH 1/2/O y/o el antígeno p24 probablemente se han detectado utilizando HIV 1+2 Ag/Ab ELISA.

Todas las muestras inicialmente reactivas deben volver a analizarse por duplicado con VIH 1+2+O Ag/Ab ELISA antes de la interpretación final de los resultados de la prueba. Las muestras repetidamente reactivas pueden considerarse positivo para anticuerpos contra VIH 1/2 y/o antígeno p24 con VIH 1+2+O Ag/Ab ELISA.

Límite (A/C.O. = 0,9-1,1):

Se consideran muestras con absorbancia a relación de corte entre 0,9 y 1,1 límite y se requiere volver a analizar estos especímenes por duplicado para confirmar los resultados iniciales.

El seguimiento, la confirmación y las pruebas complementarias de cualquier muestra positiva con otro sistema analítico son requeridas. El diagnóstico clínico no debe establecerse sobre la base de un solo resultado de prueba debe integrar datos clínicos y de otro laboratorio.

NI = No Interpretable:

- Si, después de volver a analizar las muestras inicialmente reactivas, ambos pocillos dan resultados negativos (A/C.O. < 0,9), estas muestras deben considerarse como positivo no repetible (o falso positivo) y registrarse como negativo. Como con muchos ensayos ELISA sensibles, los resultados falsos positivos pueden ocurrir debido a varias razones, la mayoría de las cuales están conectadas con, pero no limitado al paso de lavados inadecuados.
- Si después de repetir la prueba por duplicado, uno o ambos pocillos dan resultados positivos, el resultado final de esta prueba ELISA debe ser registrada como repetidamente reactiva. Las muestras repetidamente reactivas podrían considerarse positivas para anti-HIV1+2 y/o antígeno P24.
- Después de repetir la prueba por duplicado, las muestras con valores cercanos al valor de corte deben interpretarse con precaución y considerada como muestra de zona "límite", o no interpretable para el momento de la prueba.

Limitaciones:

- Los anticuerpos y/o el antígeno P24 pueden ser indetectables durante la etapa inicial de la enfermedad. Por lo tanto, los resultados negativos obtenidos con HIV1+2+O Ag/Ab ELISA son solo una indicación de que la muestra no contiene un nivel detectable de anticuerpos contra el virus del VIH y cualquier resultado negativo no debe considerarse una prueba concluyente de que el individuo no está infectado con el VIH o la unidad de sangre no está infectada con el VIH.
- Los errores de análisis más comunes son: uso de kits más allá de la fecha de caducidad, procedimientos de lavado incorrectos, contaminación reactivos, pasos incorrectos del procedimiento de ensayo, aspiración insuficiente durante el lavado, falta de adición de muestras o reactivos, operación inadecuada con el equipo de laboratorio, errores de tiempo, el uso de especímenes altamente hemolizados o muestras que contengan fibrina, muestras de suero incompletamente coaguladas.
- El control positivo del kit de prueba no debe utilizarse para cuantificar la sensibilidad del ensayo. El control positivo se utiliza para verificar que los componentes del kit de prueba sean capaces de detectar una muestra reactiva, siempre que se siga el procedimiento definido en el kit y se cumplan estrictamente las condiciones de almacenamiento.

Referencias:

1. Barbe, F. et al. (1994) Detección temprana de anticuerpos contra el VIH-1 mediante un inmunoensayo enzimático de tercera generación. Ana. Biol. Clin. (París), 52:341-345.
2. Barre-Sinoussi, F et al., (1984) Aislamiento de un retrovirus linfotrópico T de un paciente con riesgo de contraer síndrome de inmunodeficiencia (SIDA), Science, 220: 868-871.
3. Clave, F. et al. (1991) Preferencias de conformación de solución de péptidos inmunogénicos derivados de la principal determinación de la neutralización de la glicoproteína gp120 de la cubierta del VIH-1. Bioquímica. 30: 9187-9194.
4. Constantino, N., T. et al., (1993) Prueba serológica para los retrovirus: acercándose a una década de evolución. SIDA, 7: 1-13 Gnanon JW et al. (1987) Ciencia; 237: 1346-1349.
5. Barbe, F. et al., (1994), detección temprana de anticuerpos contra el VIH-1 por una enzima de tercera generación inmunoensayo. Ann. Biol. Clin. (París), 52, 341-345.

