HIV 1/2

Uso Previsto:
Inmunoensayo para la determinación cualitativa in vitro de HIV-1 y HIV-2 en suero/plasma humano (ligado a enzimas).

Principio de la Prueba:
El inmunoensayo de HIV-1 y HIV-2 utiliza un ensayo sándwich de doble antígeno para detectar anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (tipo 1 + 2). Los pocillos de las placas de microtítulos están prerrecubiertos con antígeno recombinante del virus de la inmunodeficiencia humana (gp36, gp41, gp120). Durante la prueba, si las muestras contienen anticuerpos contra el VIH, se combinarán con el antígeno recombinante del virus de la inmunodeficiencia humana recubierto, se eliminarán los componentes libres y se agregará el antígeno recombinante del virus de la inmunodeficiencia humana marcado con peróxidos de rábano picante para formar un complejo de antígeno doble y se lavará para eliminar los componentes libres, se agregará el sustrato TMB, se leerá el valor de absorbancia con un lector de microplacas y se juzgará el resultado.

Materiales Proporcionados:
• Microplaca recubierta, 8 x 12, 96 pocillos, recubierta previamente con anticuerpos anti-VIH.
• Conjugado enzimático, 1 vial, 10,5 ml de HRP. Listo para usar.
• Control Negativo: 1 vial de 1 ml, listo para usar.
• Control Positivo HIV-1: 1 vial de 1 ml, listo para usar.
• Control Positivo HIV-2: 1 vial de 1 ml, listo para usar.
• Diluyente de muestra, 1 vial de 11 ml, listo para usar.
• Sustrato A: 1 vial de 7 ml cada uno, listo para usar.
• Sustrato B: 1 vial de 7 ml cada uno, listo para usar.
• Solución de parada, 1 vial, 6 ml.
• Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 20 ml (concentrado 40X), Contiene fosfato, NaCl y Tween-20.
• 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 desmineralizada.

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 3 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.
• Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
• 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.
• Después de obtener el número requerido de tiras, la placa debe colocarse en la bolsa de plástico con cierre con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo.
• 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.

Almacenamiento:
• Almacenar a 2-8ºC
• 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 calibradores 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:
• Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas.
• Las muestras de suero pueden analizarse mediante este procedimiento, separe suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
• Las muestras cubiertas se pueden almacenar hasta 48 horas a 2~8°C.
• Las muestras conservadas durante más tiempo se pueden congelar a –20 °C y evitar la congelación de fusión repetida.
• Centrifugar muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
• Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición.
• Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba que debe ser eliminado por centrifugación. Asegúrese de que la formación completa del coágulo en las muestras de suero ha tenido lugar antes de la centrifugación.

Control de Calidad:
Cada laboratorio debe tener muestras de controles en los niveles bajo, normal y rango elevado para monitorear el rendimiento de la prueba. Debe haber controles tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado.
El requisito de controles recomendados para este ensayo es utilizar un control por separado y probarlos junto las muestras dentro de la misma corrida. El resultado es válido si los valores de control están dentro de la concentración rangos impresos en las etiquetas.

Solución de Lavado (Dilución 40X):
Diluya 20 ml de Solución de Lavado Concentrada en 780 ml de agua desionizada, para un volumen final de 800 ml. Estable por 1 semana temperatura ambiente.

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 deben establecer duplicado.
• Agregue 100 µL de control negativo, control positivo y muestras a cada pocillo. No agregue control positivo para HIV-2 si no es necesario.
• Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
• Cubra la placa con la tapa placa e incube 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, 20 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 de enzima conjugada a cada pocillo (no agregue al pocillo del blanco).
• Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 30 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, 20 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.
• Dispense 50 µl de sustrato A en cada pocillo (no agregue al pocillo del blanco).
• Dispense 50 µl de sustrato B en cada pocillo (no agregue al pocillo del blanco).
• Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 30 minutos
• Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo (no agregue al pocillo del blanco).
• 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:
Colorimetría: Lea el valor OD a 450 nm con un lector de microplacas.
El valor medio de OD de control negativo ≤ 0,1 y el valor OD de control positivo ≥ 0,8, la prueba es válida, de lo contrario, la prueba no es válida.
Valor de corte (C.O.) = Control negativo medio + 0,12.

Resultados positivos: Ejemplo de valor OD ≥ C.O.
Las muestras que dan una absorbancia igual o superior al valor de corte se consideran inicialmente reactivas, lo que indica que probablemente se ha detectado HIV-1 y HIV-2 utilizando HIV ELISA. Todas las muestras inicialmente reactivas deben volver a analizarse por duplicado utilizando HIV ELISA antes de la interpretación final de los resultados del ensayo. Las muestras repetidas que reaccionan pueden considerarse positivas para HIV con HIV ELISA.

Resultados negativos: Ejemplo de valor OD < C.O.
Las muestras que dan una absorbancia inferior al valor de corte son negativas para este ensayo, lo que indica que no se ha detectado anticuerpos contra el HIV-1 y el HIV-2 con HIV ELISA, por lo que es probable que el paciente no esté infectado con HIV y que la unidad de sangre no contenga anticuerpos contra el HIV y podría transfundirse en el caso de que otros marcadores de enfermedades infecciosas también estén ausentes. Se requiere seguimiento, confirmación y pruebas complementarias de cualquier muestra positiva con otro sistema analítico (por ejemplo, PCR). El diagnóstico clínico no debe establecerse a partir de un solo resultado de la prueba. Debe integrar los datos y hallazgos clínicos y otros datos de laboratorio.

Limitaciones:
1. Los resultados positivos deben confirmarse con otro método disponible e interpretarse junto con la información clínica del paciente.
2. El reactivo es un reactivo cualitativo y no se puede utilizar como reactivo cuantitativo.
3. Este reactivo solo se utiliza para la detección de muestras de suero/plasma humano.

Características de Desempeño:
1. **Especificidad negativa:** La tasa de coincidencia debe superar 18/20 cuando se detectan muestras nacionales negativas de control de calidad con kits ELISA de anti-VIH 1/2.
2. **Especificidad positiva:** La tasa de coincidencia debe ser de 20/20 cuando se detectan muestras nacionales positivas de control de calidad con kits ELISA de anti-VIH 1/2.
3. **Límite de detección:** Al menos 3/6 resultados deben ser positivos al detectar muestras de control de calidad de límite nacional de VIH con los kits ELISA de anti-VIH 1/2, el fluido de la matriz debe resultar negativo.
4. **Precisión:** El CV no debe superar el 15%.

RJL CORPORACIÓN C.A.