



HIV BLOT 2.2 TESTE WESTERN BLOT

Instruções de Utilização



DATA DE REVISÃO: 2016-05
MAE0011-POR-4

Observação: alterações realizadas.

REF (kit de 18 testes) : 11030-018
(kit de 36 testes) : 11030-036

NOME E APLICAÇÃO

O **MP Diagnostics HIV BLOT 2.2** é um imunoenensaio qualitativo para a detecção *in vitro* de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) no soro e plasma humanos. Destina-se a ser usado como um teste complementar mais específico para amostras de soro ou plasma humanos que apresentaram resultados repetidamente reativos por procedimentos de triagem ou rastreamento, como os testes imunoenzimáticos ELISA.

INTRODUÇÃO

Existem vários testes de triagem ou rastreamento para a detecção de anticorpos tanto contra o HIV-1 como contra o HIV-2, os agentes etiológicos da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Esses testes podem ser extremamente sensíveis porém menos específicos, levando a interpretações falso positivas. Por isso, são necessários testes independentes complementares de especificidade elevada para confirmar a presença de anticorpos contra o HIV-1 e/ou HIV-2.

O kit **HIV BLOT 2.2 da MP Diagnostics** foi concebido para ser usado como teste complementar mais específico para amostras de soro ou plasma humanos que apresentaram resultados repetidamente reativos pelo teste de ELISA. Antígenos virais específicos do HIV-1 separados e incorporados em fitas por procedimentos eletroforéticos seguidos de eletrotransferência, combinados na mesma fita com um peptídeo sintético específico do HIV-2, permitem observar melhor as respostas mediadas por anticorpos para proteínas virais específicas. Cada fita inclui também um controle interno de adição de amostra para minimizar o risco de falso-negativos provocados por erros operacionais e para assegurar a adição de amostras.

Quando o substrato for conservado entre 2°C e 8°C poderão se formar precipitados. Isto não afetará o desempenho do kit.

Cuidado: Evite a exposição desnecessária do substrato à luz.

COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Podem ser usadas amostras de soro ou plasma coletadas em EDTA, heparina ou citrato de sódio. Antes do armazenamento, certifique-se que os coágulos e/ou as células sanguíneas foram separadas por centrifugação.

As amostras devem ser conservadas entre 2°C e 8°C se o teste for realizado dentro de 7 dias após a coleta, ou congeladas a -20°C se for previsto que o teste será realizado em mais de 7 dias após coleta. É preferível usar amostras limpidas e não hemolisadas. Amostras lipêmicas, ictericas ou contaminadas (partículas) devem ser filtradas (0,45µm) ou centrifugadas antes do teste.

As amostras podem ser inativadas, mas isso não é necessário para um bom desempenho do teste.

O procedimento de inativação é o seguinte:

- Afrouxe a tampa do recipiente da amostra.
- Inative termicamente as amostras a 56 °C por 30 minutos em banho-maria.
- Espere a amostra esfriar antes de fixar novamente a tampa.
- A amostra pode ser congelada até o momento da análise.

Recomenda-se não congelar e descongelar repetidamente as amostras.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Água deionizada ou destilada
- Luvas descartáveis
- Plataforma oscilante (com velocidade de agitação na faixa de 12 a 16 oscilações por minuto e com capacidade de inclinação entre 5° e 10°, para lavagem uniforme das membranas)
- Pipetadores e ponteiros de volumes adequados
- Sistema de aspiração e contenção em hipoclorito de sódio
- Banho-maria a 56°C (opcional)
- Hipoclorito de sódio para descontaminação

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA**
 - A SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA deve ser **preparada logo antes do uso**.
 - Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20X) com 19 volumes de água grau reagente. Misture bem.
- SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING**
 - A SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING deve ser **preparada logo antes do uso**.
 - Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE CONCENTRADA (10X) com 9 volumes de água grau reagente. Misture bem.

DESCRIÇÃO DE SÍMBOLOS USADOS

Os símbolos gráficos usados ou encontrados nos produtos e embalagens **MP Diagnostics** estão indicados a seguir. Estes são os símbolos mais comuns em dispositivos médicos e respectivas embalagens. Alguns dos símbolos comuns são explicados em maior pormenor na norma internacional e europeia EN ISO 15223: 2012.

| | | |
|-------------|--|---|
| | Prazo de validade Sinónimos: Usar até | IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro |
| LOT | Código do lote Sinónimos: Número do lote Código da remessa | REF Referência de catálogo Sinónimos: Número de referência N° de catálogo |
| | Limites de temperatura | |
| | Fabricante | Cuidado |
| | Conteúdo suficiente para n testes | EC REP Representante Autorizado na Comunidade Europeia |
| | Não reutilizar | |
| CONT | Índice | Consulte as instruções de utilização |

PRINCÍPIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO PROCEDIMENTO

As fitas de nitrocelulose são incorporadas com proteínas antigénicas separadas e fixadas do HIV-1, parcialmente purificado e inativado, por procedimentos de transferência (blotting) eletroforética e nas mesmas fitas incorpora-se um peptídeo sintético específico do HIV-2. Cada fita de nitrocelulose é incubada com soro ou plasma diluídos e controles. Os anticorpos específicos contra o HIV-1 e HIV-2, caso estejam presentes nas amostras, vão fixar-se às proteínas do HIV-1 e ao peptídeo do HIV-2 nas fitas. As fitas são lavadas para remover o material não fixados. Os anticorpos que se fixam, especificamente às proteínas do HIV, podem ser visualizados por uma série de reações que envolvem o uso de anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina e do substrato BCIP/NBT. Este método é suficientemente sensível para detectar quantidades mínimas de anticorpos específicos contra o HIV no soro ou plasma.

COMPONENTES DO KIT

| Descrição do Componente | Quantidade Fornecida |
|-------------------------|--|
| ANTIGEN STRIPS | FITAS DE NITROCELULOSE Incorporadas com lisado de HIV-1, com peptídeo específico do envoltório do HIV-2 e com uma banda de controle de adição de soro. Mantenha seco e ao abrigo da luz. |
| | Disponível em 18 ou 36 fitas |

- Adicione 1 g de PÓ PARA BLOTTING a cada 20 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE diluída, preparada na etapa 2(b) acima. Agite para dissolver completamente o pó.
- Agite novamente antes de aplicar.

3. SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO

Nota : Prepare a solução num recipiente ou bécher de polipropileno.

- A SOLUÇÃO DE CONJUGADO TRABALHO deverá ser **preparada logo antes do uso**.
- PROCEDIMENTO PROVA RÁPIDA:** Prepare a SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO diluindo o CONJUGADO a 1:500 em SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING, por exemplo, 10 µl de CONJUGADO para 5 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING.
- PROCEDIMENTO TESTE OVERNIGHT:** Prepare a SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO diluindo o CONJUGADO a 1:1000 em SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING, por exemplo, 5 µl de CONJUGADO para 5 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING.

4. SOLUÇÃO DE SUBSTRATO (pronta para uso)

- Distribua diretamente o volume necessário a partir do frasco. Use uma pipeta limpa. Feche bem após o uso.

| Reagentes | QUANTIDADE NECESSÁRIA DE REAGENTES PARA QUANTIDADE DIFERENTES DE FITAS | | | | | | |
|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | NÚMERO DE FITAS A USAR | | | | | | |
| | 3 | 6 | 9 | 15 | 20 | 27 | 36 |
| Solução-Tampão de Lavagem diluída (ml) | 60 | 100 | 140 | 240 | 300 | 400 | 600 |
| Solução-Tampão para Blotting (ml) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 | 160 |
| Pó para Blotting (g) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 |
| Solução de Conjugado de trabalho (ml) | 7 | 13 | 19 | 31 | 41 | 55 | 73 |
| Conjugado (µl), Prova Rápida | 14 | 26 | 38 | 62 | 82 | 110 | 146 |
| Conjugate (µl), Teste Overnight | 7 | 13 | 19 | 31 | 41 | 55 | 73 |
| Solução de Substrato (ml) | 7 | 13 | 19 | 31 | 41 | 55 | 73 |

PROCEDIMENTO DO TESTE - PROVA RÁPIDA

Nota: a) Os usuários podem usar o assay rápido ou de noite funcional os testes. As faixas do HIV são mais tornadas e mais faixas podem aparecer com o assay de noite, mas o desempenho total dos dois assays é o mesmo.

- Aspire todos os reagentes e produtos químicos usados para um recipiente de contenção com hipoclorito de sódio.
- Todas as incubações devem ser realizadas em plataforma de agitação por oscilação.

Cuidado:

Algumas amostras provocam manchas escuras no ponto da fita em que são aplicadas. Para evitar este problema, deve-se:

- Aplicar a amostra somente após a adição da SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING.
- Inclinar a bandeja ligeiramente, elevando a extremidade superior ou inferior da bandeja. A Solução-Tampão para Blotting fluirá para a extremidade mais baixa da bandeja. Adicione a amostra onde a Solução-Tampão para Blotting é coletada. Quando todas as amostras tiverem sido

CONTROLE NÃO-REATIVO
Soro humano normal inativado, não reativo para antígenos superficiais de hepatite B (HBsAg), nem para anticorpos contra HIV-1/2 e HCV. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes.

CONTROLE REATIVO FORTE
Soro humano inativado contendo título elevado de anticorpos contra HIV-1 e HIV-2, e não reativo para HBsAg nem para anticorpos contra HCV. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes.

CONTROLE REATIVO FRACO
Soro humano inativado que contém título baixo de anticorpos APENAS contra HIV-1 e não reativo para HBsAg e anticorpos contra HIV-2 e HCV. Contém azida sódica e timerosal como conservantes.

SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE CONCENTRADA (10x)
Solução-tampão Tris com soro caprino normal inativado pelo calor. Contém timerosal como conservante.

SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20x)
Tris com Tween-20. Contém timerosal como conservante.

CONJUGADO
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina. Contém azida sódica como conservante.

SUBSTRATO
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotrazólio (NBT).

PÓ PARA BLOTTING
Leite desnatado em pó

Instruções de Utilização

Pinça

Bandejas de incubação*

Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos.

* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.

- adicionadas, retorne a bandeja à posição horizontal original. Certifique-se que as fitas mantêm-se sempre úmidas durante o procedimento.
- Alternativamente, caso não deseje inclinar a bandeja, as amostras podem ser adicionadas na extremidade superior ou inferior do poço. Desta forma, a leitura da fita não será afetada caso tenham se desenvolvido manchas escuras.

Procedimento:

- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA a cada poço. **2 ml**
- Usando pinça, retire cuidadosamente o número necessário de FITAS do tubo e coloque-as em cada poço com a face numerada voltada para cima. Inclua fitas para controles Reativo Forte, Reativo Fraco e Não Reativo. **2 minutos**
- Incube as fitas durante **1 e 2 minutos** à temperatura ambiente (25±3°C) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 12 a 16 ciclos por minuto). Remova a solução-tampão por aspiração. (Nota: Não permita que as fitas sequem a falha pode resultar em marcas aquosas em tiras desenvolvidas para alguns espécimes.) **2 minutos**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING a cada poço. **2 ml**
- Adicione 20 µl de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados. Deve-se ter cuidado para ser a certeza que as amostras não são adicionadas diretamente sobre as fitas. **20 µl**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING a cada poço. **60 minutos**
- Adicione 20 µl de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados. (Nota: Não permita que as fitas sequem a falha pode resultar em marcas aquosas em tiras desenvolvidas para alguns espécimes.) **60 minutos**
- Retire cuidadosamente a tampa, evitando respingos ou misturar as amostras. Incline a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Troque as ponteiros de aspiração entre as aplicações de amostras para evitar contaminação cruzada. **3 x 2 ml**
- Lave cada fita 3 vezes com 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA e deixe-as imersas durante **5 minutos** sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem. **3 x 2 ml**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO a cada poço. **2 ml**
- Cubra a bandeja e incube durante **1 hora** à temperatura ambiente (25±3°C) na plataforma oscilante. **60 minutos**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE SUBSTRATO em cada poço. **2 ml**
- Cubra a bandeja e incube-a durante **15 minutos** na plataforma oscilante. **15 minutos**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE SUBSTRATO em cada poço. **2 ml**
- Aspire o SUBSTRATO e enxágüe as fitas pelo menos três vezes com água de grau reagente para interromper a reação (a lavagem insuficiente nesta etapa poderá provocar o desenvolvimento de um fundo escuro). **3 x 2 ml**

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro*.
- Exclusivamente para uso profissional.
- Solicitemos consultar a documentação dos produtos para informações sobre componentes potencialmente perigosos.

INFORMAÇÕES DE SAÚDE E SEGURANÇA

CUIDADO: Este kit contém material de origem humana. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total que os produtos de sangue humano não transmitam infecções.

MANUSEIE AS AMOSTRAS ASSIM COMO OS CONTROLES REATIVOS FORTES, REATIVOS FRACOS E OS CONTROLES NÃO REATIVOS COMO AGENTES POTENCIALMENTE INFECCIOSOS. Recomenda-se que os componentes e as amostras do teste sejam manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório. O descarte deverá ser realizado de acordo com procedimentos de segurança vigentes.

O *Controle Reativo Forte*, o *Controle Reativo Fraco* e o *Controle Não Reativo* contêm timerosal e azida sódica, enquanto a Solução-Tampão Estoque Concentrada e a Solução-Tampão de Lavagem Concentrada contêm timerosal e o Conjugado contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com o cobre e o chumbo usados em alguns sistemas de canalização formando sais explosivos. Embora as quantidades usadas neste kit sejam pequenas, o descarte de materiais contendo azida deve ser feito por lavagem com volumes relativamente altos de água de forma a evitar a formação de azida metálica no sistema de canalização.

Em conformidade com a norma CE 1272/2008 (CLP), os componentes perigosos são classificados e rotulados da seguinte forma:

| | |
|------------------------------------|--|
| Componente: | TIRAS DE NITROCELULOSE |
| Palavra-sinal: | Perigo |
| Pictograma : | |
| Advertências de perigo: | H228 Sólido inflamável. |
| Recomendações de prudência: | P210 Manter afastado do calor/faixa/chama aberta/superfícies quentes. – Não fumar. P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. |
| Advertências suplementares: | Folha de dados de segurança EUH210 disponível mediante pedido |
| Contém: | 100% nitrocelulose |

| | |
|-----------------------|---|
| Componente: | TAMPÃO ESTOQUE CONCENTRADA (10x) TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO (20x) |
| Palavra-sinal: | Advertência |
| Pictograma : | |

- Usando pinça, retire cuidadosamente as fitas e coloque-as sobre toalhas de papel. Cubra com toalhas de papel e seque. Alternativamente, deixe as fitas secarem nos poços da bandeja.
- Monte as fitas sobre folha de papel branco não absorvente. Não aplique fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observe as bandas (ver Interpretação de Resultados) e interprete os resultados. Para armazenamento, conserve as fitas em local escuro.

PROCEDIMENTO ALTERNATIVO - TESTE OVERNIGHT

Procedimento:

- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA a cada poço. **2 ml**
- Usando pinça, retire cuidadosamente o número necessário de FITAS do tubo e coloque-as em cada poço com a face numerada voltada para cima. Inclua fitas para controles Reativo Forte, Reativo Fraco e Não Reativo. **2 minutos**
- Incube as fitas durante **1 e 2 minutos** à temperatura ambiente (25±3°C) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 12 a 16 ciclos por minuto). Remova a solução-tampão por aspiração. (Nota: Não permita que as fitas sequem a falha pode resultar em marcas aquosas em tiras desenvolvidas para alguns espécimes.) **2 minutos**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING a cada poço. **2 ml**
- Adicione 20 µl de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados. **20 µl**
- Cubra a bandeja com a tampa fornecida e incube *overnight* (16 - 20 horas) à temperatura ambiente (25±3°C) na plataforma oscilante. **overnight**
- Retire cuidadosamente a tampa, evitando respingos ou misturar as amostras. Incline a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Troque as ponteiros de aspiração entre as aplicações de amostras para evitar contaminação cruzada **3 x 2 ml**
- Lave cada fita 3 vezes com 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA e deixe-as imersas durante **5 minutos** sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem. **3 x 2 ml**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO a cada poço. **2 ml**
- Cubra a bandeja e incube durante **30 minutos** à temperatura ambiente (25 ±3°C) na plataforma oscilante. **30 minutos**
- Aspire o CONJUGADO dos poços. Lave como na etapa 8. **3 x 2 ml**
- Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE SUBSTRATO em cada poço. **2 ml**
- Cubra a bandeja e incube-a durante **15 minutos** na plataforma oscilante. **15 minutos**
- Aspire o SUBSTRATO e enxágüe as fitas pelo menos três vezes com água de grau reagente para interromper a reação (a lavagem insuficiente nesta etapa poderá provocar o desenvolvimento de um fundo escuro). **3 x 2 ml**

| | |
|------------------------------------|--|
| Advertências de perigo: | H373 Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida |
| Recomendações de prudência: | P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerosóis. PP501 Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação local / regional/nacional/internacional |
| Advertências suplementares: | Folha de dados de segurança EUH210 disponível mediante pedido |
| Contém: | 0,1% timerosal |

- Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais.
- Não pipete com a boca.
- Manuseie as amostras de testes, as fitas de nitrocelulose e os Controles Reativos, Fracos e Não Reativos como agentes potencialmente infecciosos.
- Use vestuário de laboratório e luvas descartáveis durante a realização do teste. Descarte as luvas em sacos plásticos para lixo biológico perigoso. A seguir, lave bem as mãos.
- É altamente recomendável que este teste seja realizado numa câmara adequada para material biológico perigoso.
- Mantenha todo o material longe de alimentos e bebidas.
- Em caso de acidente ou contato com os olhos, lave imediatamente com água em abundância e procure ajuda médica.
- Consulte imediatamente um médico caso ocorra ingestão de materiais contaminados ou contato destes com feridas abertas, ou outras soluções de continuidade da pele.
- Enxugue imediatamente derramamentos de materiais infecciosos com papel absorvente e limpe imediatamente a área contaminada com solução de hipoclorito de sódio a 1 % antes de continuar o trabalho. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em derramamentos contendo ácidos, a não ser que a área seja primeiro enxugada com papel absorvente. O material usado (inclusive as luvas descartáveis) deve ser descartado como material biológico potencialmente perigoso. Não esterilize em autoclave material que contenha hipoclorito de sódio.
- Antes do descarte, esterilize em autoclave a 121°C e 15 p.s.i. durante 30 minutos, todo o material contaminado utilizado. Alternativamente, descontamine o material em solução de hipoclorito de sódio a 5 % durante 30-60 minutos antes de descartar em sacos para lixo biológico perigoso.
- Descontamine todos os produtos químicos e reagentes usados adicionando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1 %. Deixe agir durante 30 minutos para garantir uma descontaminação eficiente.
- Não é recomendável reutilizar as bandejas de incubação.

PRECAUÇÕES ANALÍTICAS

- Para garantir um desempenho perfeito do teste é necessário **SEGUIR À RISCA** os procedimentos descritos neste Instruções de Utilização. A inobservância destes procedimentos podem acarretar resultados anómalos.
- NÃO MODIFIQUE OU SUBSTITUA REAGENTES DE UM LOTE DE KIT PARA OUTRO.** Os controles, o conjugado e as fitas de Western Blot são combinadas entre si para oferecer um desempenho perfeito. Use somente reagentes fornecidos com o kit.
- Não use componentes do kit após a data de validade impressa na caixa do kit.

- Aspire o SUBSTRATO e enxágüe as fitas pelo menos três vezes com água de grau reagente para interromper a reação (a lavagem insuficiente nesta etapa poderá provocar o desenvolvimento de um fundo escuro).
- Usando pinça, retire cuidadosamente as fitas e coloque-as sobre toalhas de papel. Cubra com toalhas de papel e seque. Alternativamente, deixe as fitas secarem nos poços da bandeja.
- Monte as fitas sobre folha de papel branco não absorvente. Não aplique fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observe as bandas (Ver Interpretação de Resultados) e interprete os resultados. Para armazenamento, conserve as fitas em local escuro.

| RESUMO DOS PROTOCOLOS DO TESTE | | | |
|--------------------------------|----------|-----------------------|---------------------------|
| Reagentes | Qtde | Temp Amb Prova Rápida | Temp Amb Prova Overnight |
| Fita de nitrocelulose | 1 | - | - |
| Solução-Tampão de Lavagem | 2 ml | 1-2 mins | 1-2 mins |
| Solução-Tampão para Blotting | 2 ml | - | - |
| Amostra | 20 µl | 60 min | Overnight (16 - 20 horas) |
| Solução-Tampão de Lavagem | 3 x 2 ml | 3 x 5 min | 3 x 5 min |
| Conjugado | 2 ml | 60 min | 30 min |
| Solução-Tampão de Lavagem | 3 x 2 ml | 3 x 5 min | 3 x 5 min |
| Substrato (pronto para uso) | 2 ml | 15 mins (ou menos) | 15 min (ou menos) |
| Água destilada | 3 x 2 ml | - | - |

CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se processar os controles Não Reativo, Reativo Forte e Reativo Fraco junto a cada teste, independentemente do número de amostras sob análise. Para que todos os resultados obtidos nos testes sejam considerados válidos, as seguintes condições deverão ser preenchidas:

1. CONTROLE NÃO REATIVO

Não se devem observar bandas específicas para HIV-1 e HIV-2 nas fitas de controle Não Reativo. A banda para o controle de soro deve ser visível (Fig 1c).

2. CONTROLE REATIVO FORTE

Todas as bandas de peso molecular relevantes devem estar evidentes. A Figura 1a fornece um guia das posições relativas de bandas visualizadas com o HIV BLOT 2.2 **MP Diagnostics** e permite a identificação das bandas observadas com o CONTROLE REATIVO FORTE. As bandas observadas são p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120/gp160. Outras bandas associadas a antígenos do centro (core) viral (p39, p42) também podem estar visíveis. Cuidado para não interpretar estas bandas erroneamente como gp41. Os antígenos de envoltório, gp41, gp120/gp160, sendo típicas de glicoproteínas, aparecem como bandas difusas. A banda viral p55 poderá aparecer levemente na faixa de Controle Reativo Forte, pois essas faixas contêm anti-p55 em baixos títulos. A banda de soro controle estará visível.

- Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais. A contaminação reduz prematuramente a vida útil dos kits e fornece resultados errôneos. Use técnicas assépticas como por exemplo pipetas ou ponteiros de pipetas descartáveis para retirar alíquotas dos frascos.
- Em cada processamento de amostras de pacientes, deve-se testar os controles do kit em paralelo.
- Use uma ponteira de pipeta nova para cada alíquota de amostra, para evitar contaminação cruzada.
- Para melhores resultados, aplique todos os reagentes enquanto ainda estiverem frios e retorne-os ao armazenamento entre 2°C e 8°C, o mais depressa possível.
- Recomenda-se que a vidraria a ser usada com os reagentes seja lavada com ácido clorídrico 2M e enxaguada abundantemente com água destilada ou deionizada antes do uso.
- Use somente água de qualidade grau reagente, deionizada ou destilada, para diluir os reagentes.
- Todos os reagentes devem ser bem misturados antes do uso.
- A solução de Conjugado de Trabalho, a Solução-Tampão de Lavagem Diluída e a Solução-Tampão para Blotting devem ser **preparadas logo antes do uso**.
- A solução de Conjugado de Trabalho deve ser preparada usando um recipiente ou bécher de polipropileno.
- Não exponha os reagentes nem realize testes em áreas que apresentem altos níveis de vapores de desinfetantes químicos (e.g., vapores de hipoclorito) durante as etapas de armazenamento ou de incubação. O contato inibe a reação colorida. Da mesma forma, não exponha os reagentes à luz intensa.
- O teste deverá preferencialmente ser realizado à temperatura ambiente (25°C ± 3°C).
- Certifique-se que as fitas de teste estão dispostas com os números nas fitas voltados para cima.
- Para a prova de Western Blot, é importante usar um agitador de plataforma oscilante e não um agitador rotativo. Caso contrário, o desempenho do kit ficará comprometido. A velocidade e o ângulo de inclinação recomendados para o agitador são de 12 a 16 ciclos por minuto, e 5 a 10 graus, respectivamente.
- Se usar equipamento automático, confira se está aferido antes do uso.
- Certifique-se que as amostras são adicionadas longe da fita. A bandeja pode ser agitada e a amostra adicionada no local onde a solução-tampão for coletada na extremidade inferior. Isto evitará a formação de manchas escuras devido à adição de amostra na fita.
- Evite o uso de congeladores do tipo *frost free* para armazenar reagentes e amostras.
- Não recomendamos o uso de amostras diluídas ou liofilizadas, pois podem fornecer resultados falsos. Se formarem parte ou a totalidade do painel GC, deverá ser efetuada a validação.

ARMAZENAMENTO

- ConsERVE o kit HIV BLOT 2.2

2. O p55 é o precursor do p24 e do p27. A banda p55 geralmente é detectada quando há forte reatividade do p24 e/ou ao p17 e seu aspecto habitual é o de uma banda fina logo acima da banda p51. Nem sempre é possível distinguir essas duas bandas e elas assumem o aspecto de uma banda única. As bandas visualizadas como p42 e p39 são ambas fragmentos de GAG e não devem ser interpretadas como gp41 (ENV).

3. A proteína p24 é abundante na tira HIV Blot 2.2. Em amostras obtidas durante a soroc conversão, sabe-se que o anti-p24 é o primeiro anticorpo a aparecer em ensaios de Western Blot. O surgimento da banda p24 em pacientes infectados pelo HIV atende aos critérios de interpretação positiva para proteína GAG formulados pela OMS e pelo CDC, além de outros critérios internacionais.

4. As bandas POL p66, p51 e p31 são geralmente detectadas simultaneamente. Contudo, as sensibilidades de p66 e p31 são maiores que a de p51.

5. A reatividade cruzada do HIV-2 é variável mas tipicamente exibe reatividade com antígenos GAG e/ou POL. No entanto, em alguns casos pode ocorrer reatividade cruzada com a banda gp160, mas raramente, com a gp41.

6. Existe também uma banda de alto peso molecular com aproximadamente 160 kDa que se presume ser uma proteína precursora de GAG-POL. Isto é observado em alguns soros com títulos elevados para HIV-2 ou indeterminados (reativos somente para GAG) mas o padrão da banda é uma banda discreta, diferente da banda difusa da gp160 do ENV.

O procedimento de interpretação envolve as seguintes etapas:

1. Confirmar se a banda de soro controle está visível. Se o controle estiver negativo, os resultados deverão ser considerados inválidos, visto que isto indica um erro técnico tal como não adição de amostra, conjugado ou substrato.

2. Identificação dos pesos moleculares de todas as bandas da fita de teste usando as fitas de Controle REATIVO FORTE e/ou FRACO como guia.

3. A interpretação da fita do teste baseia-se, pois, na detecção de padrões de bandamento específicos conforme as recomendações das autoridades competentes (i.e., Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde, etc.)

As diretrizes específicas para a interpretação podem divergir dependendo de normas locais. A MP Biomedicals recomenda seguir as normas aceitas em conformidade com os regulamentos locais. Listado abaixo estão algumas das diretrizes de critérios recomendados para as diferentes organizações internacionais.

| ORGANIZAÇÃO | CRITÉRIOS PARA INTERPRETAÇÃO SOROPOSITIVA WESTERN BLOT |
|---|--|
| Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors / Centros para Controle de Doenças (ASTPHLD/CDC) 1989, EUA | Qualquer dos dois da página 24, gp 41, gp 120/gp 160 bandas. |
| Centre National Transfusion Sanguine | Duas bandas ENV com GAG ou POL ou POL |
| World Health Organization (WHO), 1990 | Duas bandas ENV com ou sem GAG |
| Consortium for Retrovirus Serology Standardization (CRSS), 1988 USA | Uma banda ENV com p24 ou p31 |
| Crux Vermelha Americana (ARC), 1988 USA | Uma banda cada de GAG, POL e ENV |
| Chinese Center for Disease Control and Prevention (CCDCP), 2004 PRC Centro de Controle e Prevenção de Doença Chines (CCDCP), 2004 PRC | Duas bandas ENV OU uma ENV com banda P24 |
| National and State Reference Laboratories (NRL) 1987, Austrália National and State Reference Laboratories (NRL) 1987, Austrália | Uma banda ENV com qualquer uma das três de bandas GAG ou POL |
| German Association for Control of Viral Diseases (DVV) | Um ENV com pelo menos uma banda GAG ou POL, consulte também DIN 58 969, parte 41 |

Para interpretar o HIV BLOT 2.2 MP Diagnostics recomendamos aplicar as orientações. Os resultados devem ser registrados para cada banda detectada e interpretados como NEGATIVO, POSITIVO ou INDETERMINADO.

| PADRÃO | INTERPRETAÇÃO |
|--|--|
| Nenhuma banda viral específica presente | NEGATIVO |
| Deteção de anticorpos contra p17 UNICAMENTE e ausência total de outras bandas. | NEGATIVO |
| Deteção de 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) ou POL (p31, p51, p66) | HIV-1 POSITIVO |
| Deteção de 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) ou POL (p31, p51, p66) e a banda específica de HIV-2 é visível. | HIV-1 POSITIVO com INDÍCIOS DE HIV-2 |
| Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão não satisfaz os critérios para POSITIVO | INDETERMINADO ² |
| Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão não satisfaz os critérios para POSITIVO e a banda específica de HIV-2 é visível. | INDETERMINADO ² com INDÍCIOS DE HIV-2 |

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PARA INDETERMINADO

Os resultados INDETERMINADOS não devem ser usados como base para diagnóstico da infecção por HIV. Com base no fato de que a maioria das pessoas com resultado inicial INDETERMINADO infectadas com HIV-1 desenvolverão anticorpos contra o HIV dentro de 1 mês, o CDC dos EUA em 2001 recomendou que tais pessoas sejam novamente testadas para a infecção por HIV-1 >1 mês mais tarde. As pessoas com resultados INDETERMINADOS contínuos após 1 mês provavelmente não estão infectadas pelo HIV, a menos que haja suspeita de exposição recente ao HIV.

Com base em um estudo recente do Fiebig et al (2003), embora a janela para o Western Blot no caso de infecção primária por HIV-1 possa demorar mais do que 22 dias, a progressão de um blot INTERDTERMINADO para um perfil totalmente POSITIVO não demorou mais do que 8 dias. Além disso, este estágio no laboratório de ter o Western Blot INDETERMINADO sempre foi acompanhado por um RNA detectável do HIV-1 com casos de infecção verdadeira. De modo oposto, nenhuma soroc conversão foi evidente nos estudos de follow-up dos indivíduos que foram definidos como positivos e os resultados do Western Blot INDETERMINADOS, após confirmados como negativos pelo método PCR (Sethoe et al, 1995). Entretanto, é razoável considerar as pessoas com resultados Western Blot INDETERMINADOS, mas adicionalmente testadas como negativas pelo teste do RNA como dificilmente infectadas pelo HIV, especialmente quando os indivíduos testados são conhecidos como não portadores de fator de risco associados à exposição.

Em particular, as pessoas com resultados Western Blot INDETERMINADOS derivados de um algoritmo de teste usando as quatro gerações ELISAs como teste de triagem principal devem ser adicionalmente testadas para o RNA viral usando um teste com base molecular como o RT-PCR com conjuntos de positivos identificados pela quarta geração complementar 1 mês mais tarde. O design único da quarta geração ELISAs é para a deteção simultânea do antígeno e do anticorpo. Consequentemente, os espécimes identificados como positivos pela quarta geração ELISA devem conter um anticorpo ou antígeno, ou ambos. Embora mais de 95% dos casos de positivos identificados pela quarta geração ELISA fossem relacionados ao anti-HIV e verificáveis (confirmados) pelo Western Blot (Ly et al., 2000), um teste complementar usando RT-PCR pareceu inevitável para as pequenas porções de reatividade relacionada ao antígeno p24. Novamente, pessoas sem qualquer risco de infecção provavelmente não são infectadas pelo HIV, se identificadas como positivas pela quarta geração do ELISA acompanhadas pelo Western Blot INDETERMINADO, mas os resultados não puderam ser mais adiante apoiados por um resultado POSITIVO usando o teste RNA com os conjuntos principais cobrindo o HIV-1/2/O.

Entretanto, os testes dos ácidos do núcleo (NAT) para o HIV DNA ou RNA não foram aprovados para fins de diagnóstico pelas autoridades pertinentes (CDC dos EUA, 2001); (Constantine & Zink, 2005) até muito recentemente. Hoje, somente o ensaio qualitativo do RNA foi aprovado pelo FDA dos EUA para diagnóstico dos conjuntos principais e da infecção aguda por HIV-1. Assim, os algoritmos de teste recomendados pelo CDC dos EUA (2001) e pelo WHO (2004) ainda estão aguardando atualização, e o NAT ainda está para ser incluído como método para solucionar os resultados Western Blot INDETERMINADOS. Não obstante, o CDC dos EUA (2001) reconheceu que, quando em consulta com especialistas clínicos e de laboratório, o NAT pode ser útil para determinar o status da infecção entre as pessoas com Western Blot inicial INDETERMINADO.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

A deteção de anticorpos contra HIV-1 não constitui um diagnóstico da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Um BLOT NEGATIVO não garante ausência do agente causador da AIDS. Embora um blot POSITIVO para anticorpos contra o HIV-1 indique infecção pelo vírus, o diagnóstico de AIDS só pode ser feito clinicamente se a pessoa apresentar as características que definem a AIDS, estabelecida pelo Center for Disease Control (EUA), pela Organização Mundial da Saúde ou por outras autoridades competentes.

Sabe-se que pessoas que se tornaram soropositivas há pouco tempo podem apresentar padrões incompletos mas desenvolverão crescente reatividade (tanto no número quanto na intensidade das bandas) quando são acompanhadas por períodos de dois a seis meses. A maioria dos blots com resultados POSITIVOS apresentarão outras bandas virais específicas.

Os resultados INDETERMINADOS não devem ser usados como base para o diagnóstico da infecção por HIV-1. É recomendado que todos os blots INDETERMINADOS sejam repetidos usando um espécime e amostras sequenciais. Os doares de sangue com blot INDETERMINADO devem ser novamente testado usando-se um espécime novo após um mês (CDC dos EUA, 2001). Além disso, sabe-se que os anticorpos para p24 e p31 diminuem no decorrer da AIDS para uma mudança na interpretação do blot de POSITIVO PARA INDETERMINADO. A interpretação dos resultados deve então ser baseada em teste de blot subsequente e avaliações clínicas em tais situações.

Devido à sua natureza altamente específica, a NÃO REATIVIDADE de amostras com o peptídeo específico do envoltório do HIV-2 num blot viral classificado como Indeterminado, não exclui a possibilidade de infecção por outras cepas de HIV-2.

As amostras que indicam infecções por HIV-2 devem ser posteriormente analisadas com o Kit de Western Blot para HIV-2.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

O desempenho do HIV BLOT 2.2 MP Diagnostics para a deteção de anticorpos contra HIV-1 ou HIV-2 foi avaliado em estudos clínicos.

Tabela 1 : Estudo da sensibilidade da reatividade do antígeno viral de HIV-1 com amostras soropositivas para HIV-1 (Número de amostras = 201)

| PERFIL SOROLÓGICO | HIV BLOT 2.2 | HIV-1 WB DUPONT/ORTHO |
|---------------------------------|--------------|-----------------------|
| GAG, POL e ENV | 97,5% | 95,4% |
| p24, p31, gp41 e/ou gp120/gp160 | 94,9% | 90,9% |
| ENV e GAG ou POL | 100,0% | 100,0% |

Tabela 2: Estudo da especificidade da reatividade de antígeno viral de HIV-1 com amostras de doadores normais e soros com outras infecções virais.

| TIPO DE AMOSTRA | NÚMERO | POSITIVOS | REATIVIDADE PARA HIV-1 | |
|------------------|------------|-----------|----------------------------|------------|
| | | | INDETERMINADA ¹ | NEGATIVA |
| Doadores Normais | 208 | 0 | 11 | 197 |
| HTLV-1 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| CMV | 5 | 0 | 1 | 4 |
| EBV (IgM) | 5 | 0 | 1 | 4 |
| V.zoster (IgG) | 5 | 0 | 1 | 4 |
| Sarampo | 6 | 0 | 2 | 4 |
| Rubéola | 5 | 0 | 1 | 4 |
| Caxumba | 4 | 0 | 1 | 3 |
| Adenovírus | 5 | 0 | 2 | 3 |
| HSV | 5 | 0 | 0 | 5 |
| Dengue | 5 | 0 | 1 | 4 |
| Total | 258 | 0 | 21 | 237 |

¹Todas exibiam apenas as bandas p24 ou p17.

Tabela 3 : Estudo da sensibilidade da banda do peptídeo do HIV-2 com amostras soropositivas para HIV-2. (Número de amostras = 178)

| Western Blot HIV-2 Perfil sorológico* | Reatividade para o peptídeo do HIV-2 | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|----------|
| | Positiva | Negativa |
| GAG, POL e 2 ENV | 160 | 0 |
| GAG, POL e 1 ENV | 18 | 0 |

*Soros definidos como positivos pelo NEW LAV Blot 2 da Diagnostics Pasteur.Dados fornecidos pelos Drs. Oliviero E. Varnier e Flavia Lillo. Laboratório de Retrovírus Humanos, Universidade de Gênova.

Tabela 4 : Estudo da especificidade da banda do peptídeo do HIV-2 com soros positivos para HIV-1, amostras de soros de doadores normais e soros com outras infecções virais.

| TIPO DE AMOSTRA | NÚMERO | REATIVIDADE PARA O PEPTÍDEO DO HIV-2 | |
|--------------------------|------------|--------------------------------------|------------|
| | | POSITIVA | NEGATIVA |
| Soropositivo para HIV-1 | 197 | 16 ^a | 181 |
| Doadores Normais | 208 | 0 | 208 |
| Soropositivo para HTLV-1 | 5 | 0 | 5 |
| CMV | 5 | 0 | 5 |
| EBV (IgM) | 5 | 0 | 5 |
| V.zoster (IgG) | 5 | 0 | 5 |
| Sarampo | 6 | 0 | 6 |
| Rubéola | 5 | 0 | 5 |
| Caxumba | 4 | 0 | 4 |
| Adenovírus | 5 | 0 | 5 |
| HSV | 5 | 0 | 5 |
| Dengue | 5 | 0 | 5 |
| Total | 455 | 16 | 439 |

^aQuando analisadas pelo Western Blot para HIV-2 da MP Diagnostics, 6 destas amostras apresentaram reatividade com ENV e GAG ou POL. 9 reagiram apenas com GAG e/ou POL e 1 amostra era negativa.

Um total de 15 painéis comerciais de soroc conversão de HIV-1 foram testados com HIV Blot 2.2 MP Diagnostics e os resultados mostraram que o HIV Blot 2.2 MP Diagnostics foi capaz de detectar anticorpos contra HIV antecipadamente ou na mesma amostra em todos os painéis.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE EXPLICITA LIMITADA

O fabricante não oferece nenhuma outra garantia expressa senão a de que o kit de teste funcionará como um ensaio de diagnóstico *in vitro* dentro das especificações e limitações descritas neste Instruções de Utilização do Produto quando usado em conformidade com as instruções nele contidas. O fabricante isenta-se de qualquer garantia, expressa ou implícita, incluindo as garantias expressas ou implícitas em relação à capacidade de comercialização, de utilização ou utilidade implícita para quaisquer outros fins. A responsabilidade do fabricante limita-se à substituição do produto ou ao reembolso do preço de compra do produto. O fabricante não será considerado responsável pelo comprador nem por terceiros por quaisquer danos, prejuízos ou perdas de caráter econômico causados pelo uso ou aplicação do produto.

PROBLEMAS TÉCNICOS/ QUEIXASPROBLEMAS TÉCNICOS / QUEIXAS

Caso haja algum problema técnico ou queixa, solicitamos proceder da seguinte forma:

1. Anote o número de lote do kit e a data de validade.
2. Conserve o kit e os resultados obtidos.
3. Contate o escritório MP Biomedicals mais próximo ou o seu distribuidor local.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
2 Pioneer Place
Singapore 627885
Tel N° : + 65 6775 0008
Fax N° : + 65 6774 6146
E-mail : enquiry_ap@mpbio.com

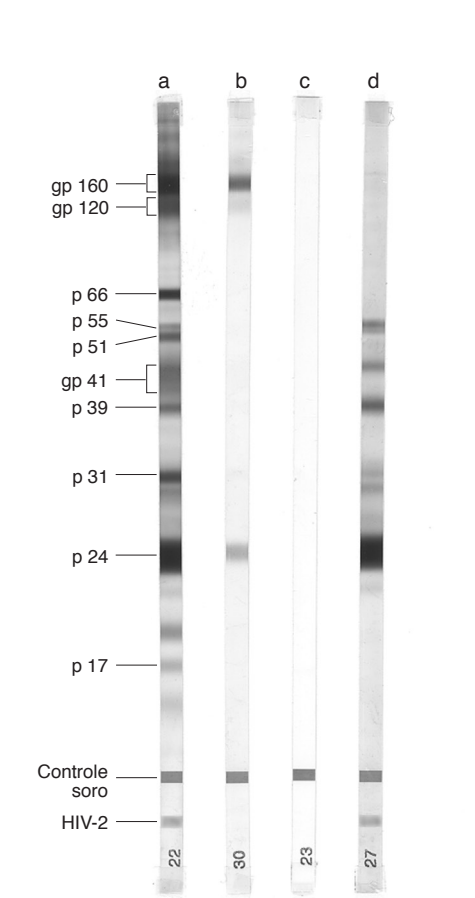
MP Biomedicals Germany GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Alemanha
Tel N° : +49 5651 921 204
Fax N° : +49 5651 921 181
E-mail: diagnostics@mpbio.com

Escritórios Regionais:

MP Biomedicals Germany GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Alemanha
Tel N° : +49 5651 921 204
Fax N° : +49 5651 921 181
E-mail: diagnostics@mpbio.com

* E.U.A. Patente 5.721.095

FIGURA 1



- a. Controle Reativo Forte (Reativo para HIV-1 e HIV-2)
- b. Controle Reativo Fraco (Reativo somente para HIV-1).
- c. Controle Não Reativo.
- d. Um soro soropositivo para HIV-2 característico.

