



HIV-1 BLOT 1.3 TESTE WESTERN BLOT Instruções de Utilização

CE 0123

DATA DE REVISÃO: 2016-05
MAJ0011-POR-3

Observação: alterações realizadas

REF (kit com 18 testes) : 11010-018
(kit com 36 testes) : 11010-036
(kit com 108 testes) : 11010-108

NOME e APLICAÇÃO

O **MP Diagnostics HIV-1 BLOT 1.3** é um imunoensaio qualitativo para a detecção *in vitro* de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana para HIV-1 no soro ou plasma humanos. Destina-se a ser usado como um teste suplementar 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 contra o HIV-1, 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 .

O kit **HIV-1 BLOT 1.3 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 tiras por procedimentos eletroforéticos seguidos de eletrotransferência, permitem observar melhor as respostas mediadas por anticorpos para proteínas virais específicas. Cada tira 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.

COMPONENTES DO KIT		
Descrição do Componente	Quantidade Fornecida	
ANTIGEN STRIPS		
TIRAS DE NITROCELULOSE	Disponível em 18 ou 36 tiras	
Incorporadas com lisado viral de HIV-1, e com uma banda de controle de adição de soro. Mantenha seco e ao abrigo da luz.		
CONTROL 		
CONTROLE NÃO REATIVO	1 frasco (80 µl)	3 frascos (80 µl)
Soro humano normal inativado, não reativo para antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpos contra HIV-1/2 e HCV. Contém azida sódica e timerosal como conservantes.		

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.
- Esperre 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) A SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA deve ser **preparada logo antes do uso**.

(b) Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20X) com 19 volumes de água grau reagente. Misture bem.
- SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTING**

(a) A SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTING deve ser **preparada logo antes do uso**.

(b) Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE CONCENTRADA (10X) com 9 volumes de água grau reagente. Misture bem.

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

(d) Agite novamente antes de aplicar.
- SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO**

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

(a) A SOLUÇÃO DE CONJUGADO TRABALHO deverá ser **preparada logo antes do uso**.

(b) **PROCEDIMENTO RÁPIDO**: Prepare a SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO diluindo o CONJUGADO

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 pomenor na norma internacional e europeia EN ISO 15223: 2012.

	Prazo de validade <i>Sinónimos:</i> Usar até		Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote <i>Sinónimos:</i> Número do lote Código da remessa		Referência de catálogo <i>Sinónimos:</i> Número de referência Nº de catálogo
	Limites de temperatura		Cuidado
	Fabricante		Representante Autorizado na Comunidade Europeia
	Contém o suficiente para <n> testes		Consulte as Instruções de Utilização
	Não re-utilizar		Índice

PRINCÍPIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO PROCEDIMENTO

As tiras de nitrocelulose são incorporadas com proteínas antigênicas separadas e fixadas do HIV-1, parcialmente purificado e inativado, por procedimentos de transferência (blotting) eletroforética. Cada tira de nitrocelulose é incubada com soro ou plasma diluídos e controles.Os anticorpos específicos contra o HIV-1, caso estejam presentes nas amostras, vão fixar-se às proteínas do HIV-1 nas tiras. As tiras são lavadas para remover os materiais não fixados. Os anticorpos que se fixam, especificamente às proteínas do HIV-1, 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-1 no soro ou plasma.

COMPONENTES DO KIT		
Descrição do Componente	Quantidade Fornecida	
ANTIGEN STRIPS		
TIRAS DE NITROCELULOSE	Disponível em 18 ou 36 tiras	
Incorporadas com lisado viral de HIV-1, e com uma banda de controle de adição de soro. Mantenha seco e ao abrigo da luz.		
CONTROL 		
CONTROLE NÃO REATIVO	1 frasco (80 µl)	3 frascos (80 µl)
Soro humano normal inativado, não reativo para antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpos contra HIV-1/2 e HCV. Contém azida sódica e timerosal como conservantes.		

CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

PROCEDIMENTO DO ENSAIO - PROCEDIMENTO RÁPIDO
Nota: a) Os usuários podem utilizar o procedimento rápido ou overnight (noturno) para realização dos testes. As bandas de HIV no procedimento overnighth são mais desenvolvidas e mais bandas podem aparecer., mas o desempenho total dos dois procedimentos é o mesmo.
b) Aspirar todos os reagentes, e produtos químicos usados para um recipiente de contenção com hipoclorito de sódio
c) Todas as incubações devem ser realizadas na plataforma de agitação
Cuidado: Algumas amostras provocam manchas escuras no ponto da tira em que são aplicadas. Para evitar este problema, deve-se:
i. Aplicar a amostra somente após a adição da SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTING.
ii. Inclin ar 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 adicionadas, retorne a bandeja à posição horizontal original. Certifique-se que as tiras mantêm-se sempre úmidas durante o procedimento.
iii. Alternativamente, caso não queira inclinar a bandeja, as amostras podem ser adicionadas na extremidade superior ou inferior do poço. Desta forma, a leitura da tira não será afetada caso tenham se desenvolvido manchas escuras.

CONTROL 
--

CONTROLE REATIVO FORTE

Soro humano inativado contendo título elevado de anticorpos contra HIV-1 e não reativo para HBsAg e anti-HCV. Contém azida sódica e timerosal como conservantes.

CONTROL 		
CONTROLE REATIVO FRACO <p>Soro humano inativado que contém título baixo de anticorpos APENAS contra HIV-1 e não reativo para HBsAg e HCV. Contém azida sódica e timerosal como conservantes.</p>		
BUF 		
SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE CONCENTRADA (10x)	1 frasco (20 ml)	3 frascos (80 µl)
Solução-tampão Tris com soro caprino normal inativado pelo calor. Contém timerosal como conservante.		
BUF 		
SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20x)	1 frasco (70 ml)	3 frascos (70 ml)
Tris com Tween-20. Contém timerosal como conservante		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.		
SUBSTRATO	1 bottle (100 ml)	3 bottles (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).		
PÓ PARA BLOTING	10 embalagens (1g cada)	30 embalagens (1g cada)
Leite desnatado em pó		
Instruções de Utilização	1 exemplar	1 exemplar
Pinça	1 par	1 par
Bandejas de incubação*		
Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos (18/36 testes) e 12 processamentos (108 testes).		
* Tabuleiros de incubação fornecidos mas embalados separadamente em relação ao kit.		

CONJUGATE	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
CONJUGADO	1 frasco (160 µl)	3 frascos (160 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.</		

pelo HIV apresentam-se reativas a este antígeno que não pertence ao HIV, mas que parece ter origem na linhagem de células humanas utilizadas para cultivar o HIV. As bandas visualizadas como p42 e p39 são ambas fragmentos de GAG e não devem ser interpretadas como gp41 (ENV).

2. O p55 é o precursor do p24 e do p27. A banda p55 geralmente é detectada quando há forte reatividade ao 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.

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

4. A reatividade cruzada do HIV-2 é variável mas tipicamente exige 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.

5. 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:

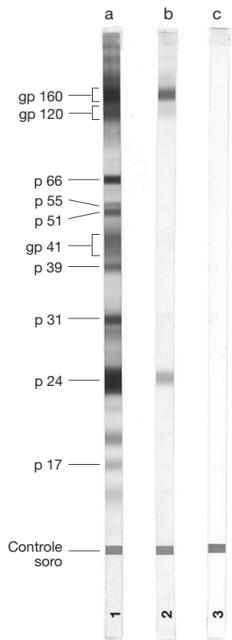
1. Confirmar se a banda de soro controle está visível. Se o controle estiver negativo, os resultados deverão ser considerados inválidos, visto que isto indica um erro técnico tal como não adição de amostra, conjugado ou substrato.
2. Identificação dos pesos moleculares de todas as bandas da tira de teste usando as fitas de Controle REATIVO FORTE e/ou FRACO como guia.
3. A interpretação da tira do teste baseia-se, na detecção de padrões de bandeamento 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/CCDC) 1989, EUA	Qualquer dos dois da página 24, gp41, gp 120/gp 160 bandas.
Centre National Transfusion Sanguine	Duas bandas ENV com GAG ou POL
Organização Mundial da Saúde (WHO), 1990	Duas bandas ENV com ou sem GAG ou POL
Consortium for Retrovirus Serology Standardization (CRSS), 1988 USA	Uma banda ENV com p24 ou p31
Cruz 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 Chinês (CCDCP), 2004 PRC	Duas bandas ENV OU uma ENV com banda p24

7

FIGURA 1



- a) Controle Reativo Forte
b) Controle Reativo Fraco
c) Controle Não Reativo.

10

National and State Reference Laboratories (NRL) 1987, Austrália National and State Reference Laboratories (NRL)	Uma banda ENV com qualquer uma das três de bandas GAG ou POL
German Association for Control of Viral Diseases (DVV) 1987, Austrália	Um ENV com pelo menos uma banda GAG ou POL, consulte também DIN 58 968, parte 41

Para interpretar o HIV-1 BLOT 1.3. **MP Diagnostics** recomendamos aplicar as orientações Seguintes. 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
Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão não satisfaz os critérios para POSITIVO	INTEDETERMINADO ²

¹INTERPRETAÇÃO 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 INTERDERMINADO 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 soroconversão 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 principais cobrindo HIV-1/2/O. Se necessário, um follow-up deve ser considerado com qualquer teste complementar 1 mês mais tarde. O design único da quarta geração ELISAs é para a detecção simultânea do antígeno e do anticorpo. Conseqüentemente, 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 verdadeiros 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 exposição 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.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A detecção 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 reunir 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 blots INDETERMINADOS não deverão ser usados como base para o diagnóstico de infecção por HIV. Recomenda-se que todos os BLOTS INDETERMINADOS sejam reanalisados usando-se a amostra original e amostras subsequentes. Os doadores de sangue com blots INDETERMINADOS devem ser novamente testados usando-se uma amostra nova, após dois a seis meses. Sabe-se também que anticorpos específicos para p24 e p31 diminuem no decorso da AIDS, ocasionando uma mudança na interpretação do blot de POSITIVO para INDETERMINADO. Em tais situações, a interpretação dos resultados deve portanto ser baseada em testes de blot e avaliações clínicas subsequentes.

Como HIV-1 e HIV-2 podem apresentar reações cruzadas, uma amostra positiva para o HIV-2 isoladamente, pode resultar como uma amostra INDETERMINADA no HIV-1 BLOT 1.3 **MP Diagnostics**. Se uma amostra para HIV-2 isoladamente é suspeita, um teste para HIV-2 mais específico como o HIV-2 Western Blot 1.2 da **MP Diagnostics**, poderá ser usado para a confirmação da infecção pelo HIV-2 isoladamente. O HIV-1 BLOT 1.3 **MP Diagnostics** não é indicado para diagnosticar o HIV-2.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO DESEMPENHO

O desempenho do HIV-1 BLOT 1.3 **MP Diagnostics** é similar ao HIV BLOT 2.2 **MP Diagnostics**. Técnica e biologicamente eles são similares:

- Condições de uso
- especificações/ propriedades
- design
- métodos de utilização
- princípios de operação ; e
- materiais semelhantes em contato com semelhantes fluidos

A única diferença entre os dois produtos/procedimento é a ausência da banda peptídeo sintético do HIV-2.

8

Conseqüentemente a sensibilidade e especificidade da performance do HIV-1 BLOT 1.3 **MP Diagnostics** para a detecção de anticorpos para HIV-1 é a mesma do HIV BLOT 2.2 **MP Diagnostics**, conforme tabela:

Sensibilidade e Especificidade

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
Herpes simplex	5	0	0	5
Dengue	5	0	1	4
Total	258	0	21	237

¹Todas exibiam apenas as bandas p24 ou p17.

Soroconversão

Um total de 15 amostras de HIV-1 de um painel de soroconversão foi testado com o HIV-1 BLOT 1.3 **MP Diagnostics** e os resultados mostraram que o HIV-1 BLOT 1.3 **MP Diagnostics** era capaz de detectar anticorpos para HIV precocemente ou na mesma amostra em todos os painéis.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE EXPLÍCITA 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/ 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.

REFERÊNCIAS

1. V.C.W.Tsang, K. Hancock, M. Wilson. D.F. Palmer, S. Whaley, J.S. Mc Dougal, and S. Kennedy. March 1985. Developmental Procedure : Enzyme-linked Immuno-electro-transfer Blot technique for HTLV-III/LAV antibodies; CDC, Atlanta.
2. H. Towbin, T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
3. J. Schupbach, M. Popovic, R. V. Gilden. M.A. Gonds, M. G. Sarnagadharan and R. C. Gallo. 1984. Serological Analysis of subgroup of Human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. Science 224, 503-505.
4. M. G. Sarnagadharan, M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach and R. C. Gallo. 1984. Antibodies reactive with human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 224, 506-608.
5. Centre for Disease Control. 1985. " Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing Acquired Immune Deficiency Syndrome" - United States Morbidity and Mortality Weekly Report 34 (1):1-5.
6. WHO Collaborating Group on HIV-2 1990, WHO Weekly Epidem. Rec. 10, p74-75.
7. F. Clavel, D. Guetard., F. Brun-Vezinet, et al. 1986 Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science; 233:343-346,
8. F. Clavel., 1987. HIV-2, the West African AIDS virus. AIDS 1:135-140,
9. R.S. Tedder, A. Hughes, T. Corrah et al 1988. Envelope cross-reactivity in Western Blot for HIV-1 and HIV-2 may not indicate dual infection. Lancet 11:927-930,
10. Bottiger B., A. Karlsson, F. Andreasson et al. 1990. Envelope cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 detected by different serological methods: Correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. J. Virol. 64(7):3492-3499.
11. Ming Guan, Frequency, causes and new challenges of indeterminate results in Western Blot Confirmatory Testing for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus. Clinical and Vaccine Immunology, June 2007, Vol.14, No.6, p649-659.

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

EC REP

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

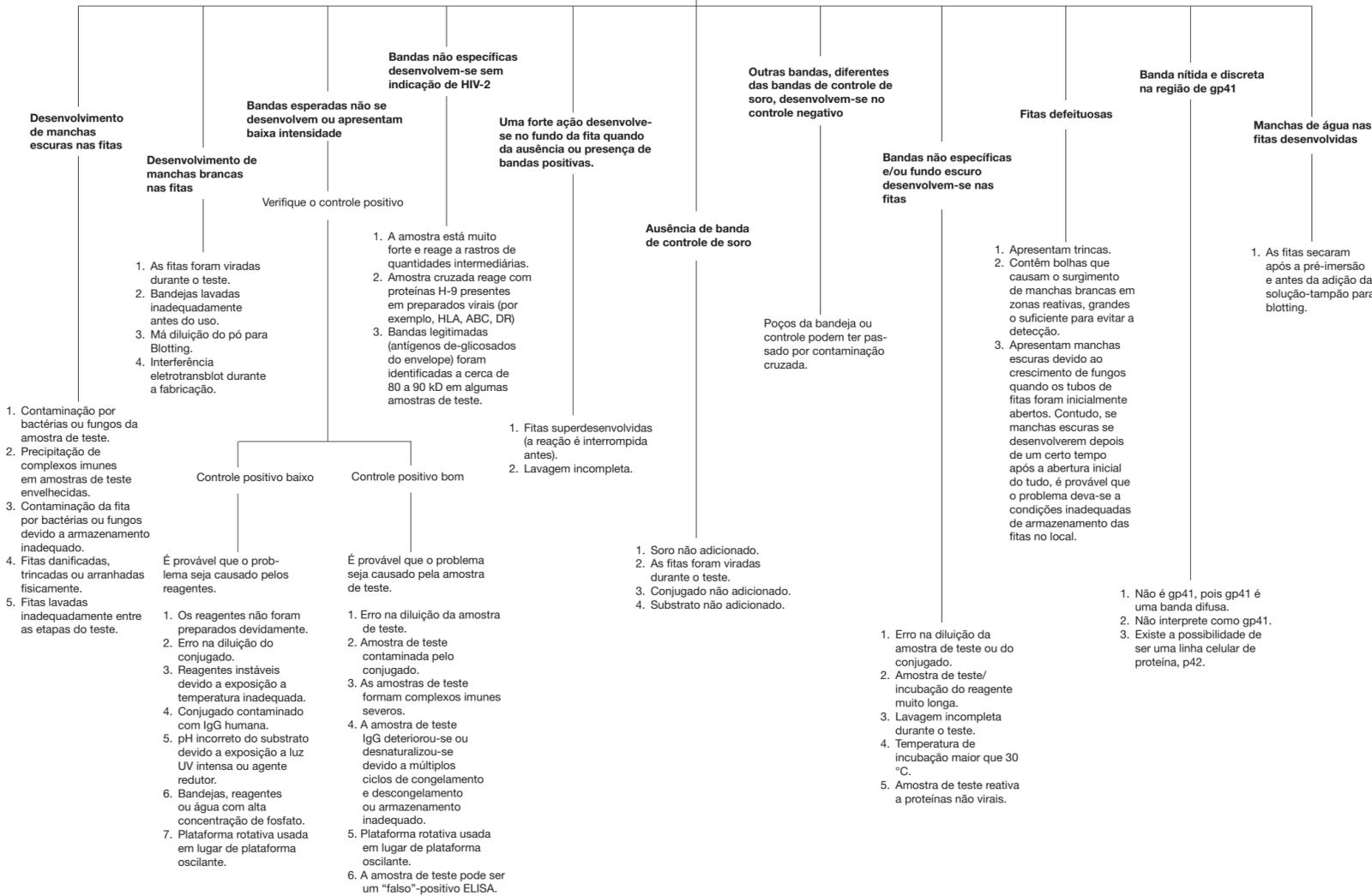
Escritórios Regionais:

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

* E.U.A. Patente 5.721.095

9

TABELA PARA SOLUÇÃO DE PROBLEMAS



11