

---

---

## INTERÉS CLÍNICO

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es una enfermedad infecciosa de etiología viral, producida por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Esta puede ser transmitida a través del contacto sexual, la exposición a sangre o sus derivados o por la utilización de materiales tales como agujas y jeringuillas contaminados; se ha demostrado también su transmisión de la madre al feto o al recién nacido durante el período perinatal (1-3).

La presencia de anticuerpos contra el VIH en suero o plasma de una persona, indica que la misma ha estado expuesta a dicho virus, y por tanto, constituye un transmisor potencial de la enfermedad (4-5).

Con el descubrimiento en países de Africa Occidental de otro tipo de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (6), al que se le denominó VIH 2 y que presenta diferencias antigénicas con el virus descrito inicialmente, denominado VIH 1, surgió la necesidad de reconocer también los anticuerpos contra el mismo.

El **UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT** es un ensayo inmunoenzimático indirecto, para la detección de anticuerpos al VIH en suero, plasma o sangre seca sobre papel de filtro, que emplea, como antígenos de captura, gp120, gp41 y p24, proteínas representativas de la envoltura y el cuerpo viral del VIH-1 (7,8), así como el antígeno gp36 (9), proteína representativa de la envoltura del VIH 2, obtenidas por métodos recombinantes (10- 14); y péptidos sintéticos. El **UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT** puede utilizarse en la detección de anticuerpos al Virus de la Inmunodeficiencia Humana en:

- 1.- La certificación de la sangre de donantes.
- 2.- Vigilancia epidemiológica de la infección por el VIH. En este caso puede emplearse el procedimiento para muestras en papel de filtro.

## FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El **UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT** utiliza como fase sólida placas de ultramicroELISA revestidas con los antígenos. Las muestras se incuban en los pocillos de las tiras y si contienen anticuerpos específicos, éstos se fijan a los antígenos del recubrimiento. La realización de un lavado posterior elimina los componentes de la muestra no fijados. Se añade entonces un conjugado anti-IgG Humana/Fosfatasa Alcalina (F.A.), el cual se unirá a los anticuerpos fijados en la reacción anterior. Un nuevo lavado eliminará entonces el conjugado en exceso.

Al añadir un sustrato fluorogénico (4-metilumbeliferil fosfato), éste será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos al VIH 1 o VIH 2 en las muestras.

**CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.  
Código UM 2022 (288 pruebas) y Código UM 2122 (480 pruebas)**

<b>Contenido:</b>	<b>UM 2022</b>	<b>UM 2122</b>
Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3	5
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL	2 x 25 mL
R2: Suero de Carnero	1 x 18 mL	1 x 18 mL
R3: Control Negativo	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
R4: Control Positivo	1 x 0,5 mL	1 x 0,5 mL
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 mL	1 x 18 mL

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante. Los controles son negativos a las pruebas de detección de HBsAg, anti VHC, anti VIH 1+2 y Sífilis. El Control Positivo ha sido inactivado por tratamiento térmico.

**Preparación de las soluciones de trabajo:**

**R1:** Para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

**R2:** Diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 mL (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare sólo lo necesario para el ensayo. Esta solución también puede utilizarse como diluyente para muestras de suero en los estuches **UMELISA HCV** y **UMELISA CHAGAS**.

**R3:** Listo para usar.

**R4:** Listo para usar.

**R5:** Listo para usar. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL

**R6:** Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

---

---

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse entre 2 y 8 °C. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses entre 2 y 8 °C en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

## MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada
- Papel absorbente.
- Hipoclorito de sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 5 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Incubadora de  $37 \pm 1$  °C.

## PRECAUCIONES

- Antes de comenzar a trabajar, compruebe que todos los reactivos, estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Manipule las muestras y los controles como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5%) o esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto con las muestras como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.
- Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y las muestras.
- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.
- Los sueros y plasmas a utilizar deben ser preferentemente frescos, no inactivados por calor y sin

- 
- precipitados. Debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de las muestras.
- Verifique que todas las tiras de reacción estén bien niveladas en el soporte.
  - Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.
  - Tome todas las precauciones para evitar la neutralización del conjugado que puede producirse por material contaminado con suero humano.
  - Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
  - Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento. Tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
  - Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
  - El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
  - Los reactivos del **UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT** de lotes diferentes no se deben intercambiar.

### PROCEDIMIENTO TÉCNICO

**1.- Preparación de las muestras y controles.** Los controles se presentan en el estuche listos para usar. La preparación de las muestras varía según se trate de muestras líquidas de suero o plasma, o de muestras de sangre seca sobre papel de filtro.

**Procedimiento A:** Para muestras de suero o plasma. Diluya las muestras 1:21 con la solución de trabajo R2 (5 µL de suero o plasma + 100 µL de la solución).

**Procedimiento B:** Para muestras de sangre colectadas en papel de filtro **S & S 903**. Corte con un perforador para papel un disco de 3 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Dépositelo en un recipiente apropiado y añádale 25 µL de solución R2 de trabajo. Mantener, como mínimo, una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C) y homogeneice ocasionalmente.

**2.- Adición de las muestras y controles a la tira de reacción.** Coloque 10 µL de las muestras previamente diluidas y de los controles sobre los pocillos de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
<b>B</b>	B	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
<b>C</b>	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
<b>D</b>	P	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
<b>E</b>	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
<b>F</b>	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
<b>G</b>	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
<b>H</b>	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

El Control Positivo (P) y el Control Negativo (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión. Como Blanco (B) utilice la solución R2 de trabajo.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

### 3.- Incubación de las muestras y controles.

**Procedimiento A:** Incube las tiras durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

**Procedimiento B:** Incube las tiras durante una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C) en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

### 4.- Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción 4 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer con mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

### 5.- Adición del conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

### 6.- Incubación del conjugado.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

### 7.- Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

---

**8.- Adición del sustrato.**

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de las tiras de reacción.

**9.- Incubación del sustrato.**

Incuba 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 25 °C). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 60 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

**10.- Lectura.**

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT o pueden hacerse manualmente por el operador siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

**CONTROL DE LA CALIDAD**

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

- Al menos uno de los duplicados del Blanco (B1 o B2) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.
- Al menos uno de los duplicados del Control Negativo (N1 o N2) debe presentar una fluorescencia que no supere en más de 10 unidades a la media del Blanco.
- Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (P1 o P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60 y 180 unidades.
- $(NN - BB)/(P - BB) < 0,1$  Donde:  
NN: Valor promedio del Control Negativo.  
BB: Valor promedio del Blanco.

P: Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo que se encuentre dentro de los límites de calidad.

**NIVEL DE CORTE**

Las muestras se consideran positivas cuando:

$$(F_i - BB)/(P - BB) \geq 0,300$$

$F_i$  = Fluorescencia de la muestra.

- Las muestras se consideran en el umbral de positividad (BL) cuando sus resultados se encuentran en una zona comprendida entre el nivel de corte y un 15 % por debajo del mismo ("zona gris").

Una muestra será "BL" cuando:  $0,300 > (F_i - BB)/(P - BB) \geq 0,255$

Para definir de una forma rápida el nivel de corte y el límite inferior de la zona gris cuando no se dispone del programa automático, se calcula el valor de fluorescencia correspondiente para cada caso:

$$F_{NC} = 0,300 (P - BB) + BB$$

$$F_{BL} = 0,255 (P - BB) + BB$$

Donde:

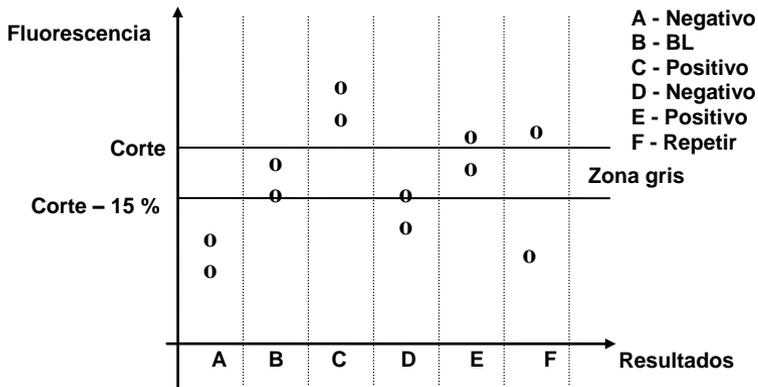
$F_{NC}$  = Valor de fluorescencia correspondiente al nivel de corte.

$F_{BL}$  = Valor de fluorescencia correspondiente al límite inferior de la zona gris.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I- Muestras analizadas por duplicado:

La interpretación de los resultados se hará según el siguiente diagrama.



II- Muestras analizadas de forma simple:

- Si se obtienen valores menores que el límite inferior de la zona gris la muestra se considera no reactiva.

- Si una muestra presenta valores mayores o iguales que el nivel de corte se considera reactiva ("**POSITIVO**").

- Si una muestra se encuentra en la zona gris ("**BL**") se considera en el umbral de positividad.

Se recomienda que toda muestra con resultado "**POSITIVO**" ó "**BL**" se repita antes de realizar una interpretación, utilizando la fuente original.

Las muestras que hayan sido encontradas repetidamente reactivas o en el umbral de positividad tienen una alta probabilidad de contener anticuerpos al VIH, especialmente si provienen de una población con alto riesgo o si el valor obtenido es muy alto con respecto al nivel de corte.

Este ensayo ha sido diseñado para obtener una máxima sensibilidad. Ocasionalmente se pueden encontrar muestras que por sus características intrínsecas pueden reaccionar inespecíficamente en el ensayo, por lo que toda muestra con resultado repetidamente "BL" o "POSITIVO" debe ser objeto de estudios confirmatorios por otro tipo de ensayos (Western Blot, RIPA) si se desea establecer con toda certeza la presencia de anticuerpos al VIH.

## CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos en muestras de suero y sangre seca sobre papel de filtro de distinta procedencia. Para estas evaluaciones se utilizó el Western Blot como prueba confirmatoria.

Tabla 1. Muestras de suero

Tipo de Muestra	Positivo	Negativo
Muestras de pacientes infectados con HIV-1	102	0
Muestras de pacientes infectados con HIV-2	13	0
Muestras de donantes de Banco de Sangre	0	864
Muestras de pacientes sin relación con el HIV	0	20
<b>Total</b>	<b>115</b>	<b>884</b>
<b>Sensibilidad</b>	<b>100 %</b>	
<b>Especificidad</b>	<b>100 %</b>	

Tabla 2. Muestras de sangre seca sobre papel de filtro

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<b>Muestras de pacientes seropositivos</b>	139	0
<b>Muestras de donantes de Banco de Sangre</b>	0	563
<b>Total</b>	139	563
<b>Sensibilidad</b>		100 %
<b>Especificidad</b>		100 %

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

1.-Desjarlis, D.C.et al.: Antibodies to a retrovirus etiologically associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in populations with increased incidence of the syndrome. *M M W R* 33:377-379, 1984.

2.-Ziegler, J.B. et al.: Postnatal transmission of AIDS associated retrovirus from mother to infant. *Lancet* i:896-897, 1985.

3.-Gallo, R.C. et al.: Frequent detection and isolation of cythopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503, 1984.

4.-Weiss, S.H. et al.: Screening test for HTLV-III (AIDS agent) antibodies: sensitivity, specificity, and applications. *JAMA* 253:221-225, 1985.

5.-HTLV-III antibody testing consensus conference: the impact of routine HTLV-III antibody testing of blood and plasma donors on public health. *JAMA* 256: 1778-1783, 1986.

6.-Veronese, F.D. et al.: Characterization of gp 41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelop gen. *Science*, 229: 1402-1404, 1985.

7.-Muesing, M.A. et al.: Nucleic acid structure and expression of the Human AIDS/Lymphadenopathy retrovirus. *Nature*, 313: 450-458, 1985.

8.-Machado, J.A. et al.: Isolation and purification of the transmembrane Gp41 HIV-1 Recombinant protein synthesized in *E. Coli*. 1er. Congreso Iberoamericano de Biotecnología. Libro de Resúmenes. (s05-050). La Habana, Cuba, 1989.

9.-Novoa, L.I. et al.: Cloning and expression of the major core HIV-1 protein in *Bacteria*. 1er. Congreso Iberoamericano de Biotecnología. Libro de Resúmenes (s05-051). La Habana, Cuba, 1989.

10.-Novoa, L.I. et al.: Development of a diagnostic system for HIV seroconversion using two recombinant antigens. *International Biotechnology Congress*. Paris, 1988.

11.-Silva, C. et al.: UMELISA con antígeno recombinante para el pesquisaje de anticuerpos Anti-VIH. III Reunión Ibero-latinoamericana de Hematología. Libro de Resúmenes. pág 203. La Habana, 1989.

12.-Albertini, A. et al.: Evaluation of the ANTI-HIV ULTRAMICROELISA (UMELISA) kit with the Ultramicroanalyte System (SUMA). *Clinical Chemistry*, 36:1091. 1990.

---

**Edición 1**  
**Noviembre 16, 2007**

**UMELISA HIV 1+2 RECOMBINANT**  
**Códigos UM 2022 y UM 2122**  
**Centro de InmunoEnsayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA.**  
**Teléfono: 208-2929, Fax: (537) 208-6514.**