



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 13047

BUENOS AIRES, 29 NOV. 2016

VISTO el expediente N° 1-47-3110-3022/15-6 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma CROMOION S.R.L. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in vitro" denominado HIV Ag-Ab ELISA / INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO CUALITATIVO DE 4ª GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VIH-1, VIH-2 Y EL ANTÍGENO p24 DE VIH-1.

Que a fojas 313 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 el por el Decreto N° 101 de fecha 16 de diciembre de 2015.

Por ello;



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 13047

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1º.- Autorizase la venta a laboratorios de análisis clínicos del productos de diagnostico para uso in Vitro denominado HIV Ag-Ab ELISA / INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO CUALITATIVO DE 4ª GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VIH-1, VIH-2 Y EL ANTÍGENO p24 DE VIH-1 en envases que se detalla en el Anexo, con una vida útil de VEINTIDOS (22) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8 °C; el que será elaborado por ADVANCED PRACTICAL DIAGNOSTICS BVBA – ApDia. Raadsherenstraat 3, B – 2300 Turnhout. (BELGICA) e importado terminado por la firma CROMOION S.R.L. y que la composición se detalla a fojas 30 a 32.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 214 a 286 y 290 a 307. Desglosándose las fojas 219 a 228, 258 a 272, 294 a 297 y 302 a 303 debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

E
JA



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 13047

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

EXPEDIENTE N° 1-47-3110-3022/15-6

DISPOSICIÓN N°: 13047

Fd


Dr. ROBERTO LEBE
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

ANEXO

Expediente Nº 1-47-3110-3022/15-6

PRODUCTO: HIV Ag-Ab ELISA / INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO CUALITATIVO DE 4ª GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VIH-1, VIH-2 Y EL ANTÍGENO p24 DE VIH-1.

PRESENTACIÓN:

	96 Determinaciones	192 Determinaciones	480 Determinaciones
MICROPLACA	1 x 12 TIRAS x 8 POCILLOS	2 x 12 TIRAS x 8 POCILLOS	5 x 12 TIRAS x 8 POCILLOS
CONTROL NEGATIVO	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
CONTROL POSITIVO 1 ^o	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
CONTROL POSITIVO 2 ^o	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
CONTROL POSITIVO 3 ^o	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
DILUYENTE DE MUESTRA	1 x 12 ml	1 x 25 ml	1 x 60 ml
CONJUGADO 1	1 x 25 ml	1 x 50 ml	1 x 120 ml
CONJUGADO 2 100x	1 vial x 250 µl	1 vial x 500 µl	1 vial x 1200 µl
DILUYENTE DEL CONJUGADO 2	1 x 25 ml	1 x 50 ml	1 x 120 ml
TAMPON DEL SUSTRATO	1 x 25 ml	1 x 50 ml	1 x 120 ml
SUSTRATO TMB	1 vial x 250 µl	1 vial x 500 µl	1 vial x 1200 µl
SOLUCIÓN DE LAVADO	1 x 50 ml	1 x 100 ml	2 x 120 ml
SOLUCIÓN DE STOP	1 x 12 ml	1 x 16 ml	1 x 30 ml

DISPOSICIÓN Nº:

13047

fd

DR. ROBERTO LEDE
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.

ROTULOS INTERNOS

29 NOV. 2016 13047

Equipo por 96 tests

217



pDia HIV Ag/Ab ELISA
MTP
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLNEG 0.65 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLPOS1 0.65 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLPOS2 0.65 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLPOS3 0.65 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD
pDia HIV Ag/Ab ELISA DILSAM 12 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CONJ1 25 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CONJ2 100x 0.25 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA DILCONJ2 25 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD
pDia HIV Ag/Ab ELISA TMB 100x 0.25 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA DILTMB 25 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA WASH 26x 50 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA STOP 12 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD

Equipo por 192 tests

pDia HIV Ag/Ab ELISA
MTP
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

Bloq. Hernán Salino
 Co-Dirección Técnica
 M. N. 7896
 CROMOION S.R.L.

pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLNEG 1.3 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLPOS1 1.3 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLPOS2 1.3 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CTLPOS3 1.3 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD
pDia HIV Ag/Ab ELISA DILSAM 25 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CONJ1 50 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA CONJ2 100x 0.5 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA DILCONJ2 50 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD
pDia HIV Ag/Ab ELISA TMB 100x 0.5 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA DILTMB 50 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA WASH 25x 100 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD	pDia HIV Ag/Ab ELISA STOP 18 ml LOT XXXXXXXX XX-XXXX IVD

[Handwritten mark]

[Handwritten signature]

Equipo por 480 tests

13047

218



epDia HIV Ag/Ab ELISA
MTP
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

mp18V12_2011.A

epDia HIV Ag/Ab ELISA
CTLNEG 3 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
CTLPOS1 3 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
CTLPOS2 3 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
CTLPOS3 3 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
DILSAM 80 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
CONJ1 120 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
CONJ2 100x 1.2 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
DILCONJ2 120 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
TMB 100x 1.2 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
DILTMB 120 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

epDia HIV Ag/Ab ELISA
WASH 25x 120 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

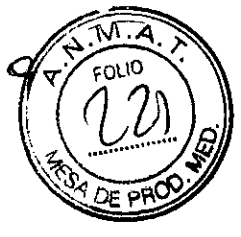
epDia HIV Ag/Ab ELISA
STOP 30 ml
 LOT XXXXXXXX
 XX-XXXX IVD

2

Bioq. Hernán Sialino
 Co-Dirección Técnica
 M. N. 7199
 GROMDIO S.R.L.

13047

219



Manual de instrucciones

Ref 790000 – Equipo por 96 determinaciones

E

Bloq. Hernán Sialho
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

A large, stylized handwritten signature in black ink, written over the printed name and company information.



INSTRUCCIONES PARA USO HIV Ag/Ab ELISA

REF 790000

IVD

CE 0123

2°C

1. Uso previsto

El HIV Ag/Ab ELISA producido por apDia es un inmunoensayo enzimático cualitativo de 4ª generación de diagnóstico *in vitro* para la detección de anticuerpos contra VIH-1, VIH-2 y el antígeno VIH-1 p24. Todos los subtipos del VIH analizados se detectan, incluyendo subtipo O.

2. Antecedentes

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) consiste en un grupo de síntomas que resultan de la inhabilitación del sistema inmune humano causado por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). La infección del VIH puede evolucionar a la fase sintomática que se caracteriza por infecciones oportunistas que pueden causar la muerte.

El agente etiológico del SIDA, el VIH, está dirigido a un tipo específico de células T, causando linfopenia y afectando la inmunidad mediada por células T. El VIH es un miembro de la familia de los retrovirus, con dos subgrupos familiares VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es más virulento y más transmisible que el VIH-2. El VIH-1 es el causante de las infecciones a nivel mundial, mientras que el VIH-2 se encuentra principalmente en los países de África occidental. Debido a que la reacción serológica cruzada entre VIH-1 y VIH-2 es muy variable y dependiente de la muestra analizada, se incluyen antígenos para la detección específica de VIH-1 y VIH-2 en el ensayo.

El VIH se transmite a través de contacto sexual con personas infectadas, por compartir agujas y jeringas con personas infectadas y por la transfusión de sangre contaminada. Los inmunoensayos enzimáticos (como el ensayo de 4ª generación HIV Ag/Ab ELISA de apDia) se recomiendan para detectar en sangre humana y plasma la presencia de anticuerpos anti VIH y antígeno VIH-1 p24.

3. Principio de la prueba

Los pocillos de la microplaca se recubren con antígenos que representan los epítopes de VIH-1 gp41 y VIH-2 gp36 en conjunto con anticuerpos monoclonales contra VIH-1 p24. Se añade suero o plasma en el pocillo, y si hay anticuerpos contra VIH-1 y/o VIH-2 (IgG, IgM o IgA) presentes en la muestra, se formarán complejos estables con los antígenos VIH unidos al pocillo. Si está presente el antígeno VIH-1 p24 se unirá a los anticuerpos en el pocillo y a los anticuerpos detectores presentes en el diluyente de la muestra. Los anticuerpos no reactivos se eliminan con el lavado. Los complejos antígeno-anticuerpo estables se identifican a través de la adición de antígenos biotinilados y de la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). Estos complejos antígeno-anticuerpo se cuantifican a través de la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano picante. Se añade

solución de sustrato de peroxidasa y se convierte en un producto de color azul. Una muestra positiva genera un color azul oscuro mientras que un color azul pálido o pocillos sin color, indican que es una muestra negativa. Al añadir solución de parada, el color de la solución cambia de azul a amarillo. La densidad óptica (DO) se mide con un espectrofotómetro (lector de ELISA) a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm y está en proporción con la cantidad de anticuerpos anti VIH-1/2 y VIH-1 p24 presentes en la muestra.



4. Componentes del Kit

Componente	Nombre indicado en el vial
1 microplaca (12 x 8 tiras) Recubierto con anticuerpos monoclonales anti VIH-1 p24, péptido específico VIH-1 gp41, proteína recombinante gp41 y péptido específico gp36 VIH-2	Tiras pre recubiertas MTP
1 vial, 650 µl, listo para usar Combinación de suero o plasma humano negativo. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control negativo CTLNEG
1 vial, 650 µl, listo para usar Control positivo para VIH-1. Contiene una combinación de sueros o plasmas positivos para VIH-1, inactivados, diluidos en una matriz proteica. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 1 CTLPOS1
1 vial, 650 µl, listo para usar Control positivo para VIH-2. Contiene una combinación de sueros o plasmas positivos para VIH-2, inactivados, diluidos en una matriz proteica. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 2 CTLPOS2
1 vial, 650 µl, listo para usar Control positivo para VIH p24. Contiene antígeno p24 recombinante diluido en una matriz proteica, concentración alrededor 100 pg/ml. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 3 CTLPOS3
1 botella, 12 ml, utilizar para diluir muestras Contiene anticuerpos monoclonales biotinilados anti VIH-1 p24. Contiene 0,05% Proclin 300.	Diluyente de la muestra DILSAM
1 botella, 25 ml, Lista para usar Contiene un péptido VIH-1 gp41 biotinilado específico, una proteína recombinante biotinilada gp41 y un péptido biotinilado VIH-2 específico gp36. Contiene 0,05% de Proclin 300.	Conjugado 1 CONJ1
1 vial, 250 µl, 100x Estreptavidina-HRP	Conjugado 2 CONJ2 100x
1 botella, 25 ml, utilizar para diluir conjugado 2 Contiene 0,05% Proclin 300.	Diluyente del conjugado 2 DILCONJ2
1 botella, 25 ml, utilizar para diluir TMB Contiene H ₂ O ₂ .	Tampón del sustrato DILTMB

Bloq. Hernán Sialino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.



E-13047

1 vial, 250 µl, 100x Contiene 0,02% Thiomersal.	TMB TMB 100x
1 botella, 50 ml, 25x Contiene detergente en solución de tampón de fosfato. Contiene 0,17 % Proclin 300.	Solución de lavado WASH 25x
1 botella, 12 ml, listo para usar H ₂ SO ₄ 1M	Solución de parada STOP
3 selladores de placas	

5. Materiales necesarios pero no suministrados

- Micropipetas de precisión calibradas
- Incubadora con termostato calibrada para incubar a 37 °C
- Agua de calidad EIA
- Agitador Vortex o similar
- Toallas de papel absorbente
- Lector de microplacas ELISA capaz de medir absorbancias a 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm

6. Advertencias y precauciones para los usuarios

- Solo para diagnóstico *in vitro*
- El kit debe ser utilizado por personal debidamente calificado en un entorno de laboratorio adecuado.
- Asegúrese de identificar las muestras debidamente. Anote la identificación de las muestras en la hoja de datos.
- Tratar los controles y las muestras como si tuvieran agentes infecciosos. El plasma o suero VIH positivo utilizados para preparar los controles, son negativos para HBsAg y VHC Ab y han sido inactivados con detergente como se describe en Horowitz B. et al., 1992, Blood: 826-831.
- El suero o plasma humano negativo utilizado en el control negativo, ha sido analizado y encontrado no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos anti VHC y anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2. Ya que ningún método conocido ofrece seguridad total que los productos derivados de sangre humana no transmitirán hepatitis u otras infecciones virales, se recomienda manipular este componente como si fuera un material potencialmente infeccioso.
- Elimine las muestras de los pacientes y todos los materiales utilizados para realizar esta prueba como si tuvieran agentes infecciosos.
- Use guantes desechables y ropa de protección al realizar un ensayo.
- La solución de parada es una solución de H₂SO₄ 1M que es irritante. En caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague con abundante agua y solicitar atención médica.
- No mezcle reactivos o microplacas recubiertas de kits con números de lote diferentes.
- Algunos componentes del kit contienen azida de sodio como conservante. Con el fin de evitar la formación de azidas metálicas potencialmente explosivas en las tuberías del laboratorio, deje fluir copiosa cantidad de agua por el desagüe después de eliminar estas soluciones.
- Informe al fabricante en caso de encontrar frascos/viales rotos ó componentes sellados/cerrados en forma inadecuada.

7. Condiciones de conservación

- Conserve el kit y sus componentes a 2-8 °C. No congele.
- Conserve las tiras de microplacas en su envase original con el desecante hasta que todas las tiras se hayan utilizado.
- Los componentes abiertos deben conservarse a 2-8°C hasta la próxima utilización y se pueden conservar por un mes.
- Para la conservación de los componentes reconstituidos consulte 9.2.
- No utilice ningún componente del kit después de la fecha de caducidad.

8. Toma de muestra y manipulación

- Se pueden utilizar muestras de suero, de plasma EDTA y de plasma citratado. Separar el suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar hemólisis; las muestras hemolizadas o lipémicas pueden producir resultados falsos.
- Manipular todas las muestras como si pudieran transmitir agentes patógenos.
- Conservar las muestras no diluidas a -20°C hasta su uso. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- No se recomienda conservar muestras diluidas ya que pueden afectar negativamente el rendimiento de la prueba.
- Mezclar la muestra antes de utilizar.

9. Procedimiento del ensayo

9.1. Observaciones generales

- Utilice una punta de pipeta desechable para cada transferencia de la muestra para evitar la contaminación cruzada.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de ser usados. El envase de las microplacas se puede abrir si ha alcanzado la temperatura ambiente. Todos los reactivos se deben mezclar sin formar espuma.
- Una vez que el ensayo se ha iniciado, se deben completar todos los pasos sin interrupción.

9.2. Reconstitución de los reactivos

Preparar solo los volúmenes necesarios para realizar la prueba planificada.

- Solución de lavado: Diluya la solución de lavado concentrada 25x en agua destilada o desionizada. Asegúrese que los cristales de sal estén disueltos antes de preparar la dilución. Ejemplo: Añada 40 ml de solución de lavado 25x a 960 ml de agua desionizada. La solución de lavado diluida se puede conservar por 1 mes a 2-8 °C.
- Conjugado 2: Diluya el Conjugado 2 concentrado (100x) en diluyente del Conjugado 2. Ejemplo: Añada 250 µl de Conjugado 2 concentrado a 25 ml de diluyente del Conjugado 2. El Conjugado 2 diluido se puede conservar durante 5 días a 2-8 °C.
- Tampón TMB/Sustrato: Diluya el TMB concentrado (100x) en Tampón del sustrato. TMB100x es sólido a 4°C. Asegúrese que el TMB está completamente disuelto antes de preparar la dilución. Ejemplo: Añada 250 µl de TMB concentrado a 25 ml de tampón de sustrato.

El tampón TMB/sustrato diluido debe utilizarse dentro de 8 horas después de su preparación; siempre mantenga esta solución lejos de la luz.

13047
222

10. Cálculo de los resultados



9.3. Procedimiento de lavado

1 ciclo de lavado se realiza de la siguiente manera:

- Añada 400 µl de solución de lavado diluida en todos los pocillos utilizados en la microplaca.
- Retire la solución de lavado inmediatamente de los pocillos invirtiendo la microplaca y golpeándola para secarla sobre una toalla de papel.
- Se puede utilizar un lavador de microplacas automático pero será necesario adaptar el procedimiento de lavado. Si fuera necesario, aumente el número de ciclos e incluya un tiempo de remojo después de cada ciclo de lavado basado en los valores de las DO de los controles positivo y negativo. Se recomienda aumentar el tiempo de remojo en incrementos de 10 segundos, hasta 90 segundos. El número de ciclos de lavados puede gradualmente aumentarse, alternativamente o simultáneamente, p. ej. x7, x5, x7. Para obtener ayuda adicional con el procedimiento de lavado, contacte a apDia.

9.4. Procedimiento de la prueba

- Tome la cantidad necesaria de tiras de la prueba y devuelva las tiras no utilizadas al envase. En cada ensayo, programe una tira para los cuatro controles: se deben incluir un control negativo y tres controles positivos en duplicado.
- Añada 100 µl de diluyente de la muestra en cada pocillo.
- Añada 100 µl de muestra/controles, pipetear aspirando y dispensando para homogenizar y sellar las tiras con sellador de microplacas.
- Incube durante 60 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, agite las tiras vigorosamente para eliminar la solución. Lave la microplaca cinco ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de solución de Conjugado 1 en los pocillos. Selle las tiras con sellador de microplacas.
- Incube el Conjugado 1 durante 30 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, se elimina el Conjugado 1 invirtiendo la microplaca y golpeándola para secarla sobre una toalla de papel. Lave la microplaca por tres ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de la solución diluida del Conjugado 2 en los pocillos. Selle los pocillos con sellador de microplacas.
- Incube durante 30 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, elimine la solución de los pocillos y lave la microplaca cinco ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de la solución de TMB diluida en los pocillos de la microplaca.
- Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) protegido de la luz.
- Después de la incubación, añada 50 µl de la solución de parada y lea la DO a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm en un lector de microplacas dentro de 30 minutos después de detener la reacción. Se recomienda empezar a leer después de 10 minutos de añadir la solución de parada.

10.1. Validez

Los resultados de los controles deben estar dentro de los criterios de aceptación antes de poder interpretar cualquiera de los resultados de las muestras.

Cálculo del promedio del control negativo NC_{PROMEDIO}:

Ejemplo: Absorbancia NC
0,021
0,025
0,046

NC_{PROMEDIO} = 0,046 / 2 = 0,023

El promedio de los valores de la absorbancia del control negativo debe ser menor que 0,100. Si el valor promedio es mayor o igual a 0,100, el ensayo debe repetirse.

Cálculo del promedio del control positivo PC_{PROMEDIO}:

Ejemplo: Absorbancia VIH-1-PC
1,545
1,239
2,784

VIH-1-PC_{PROMEDIO} = 2,784 / 2 = 1,392

Ejemplo: Absorbancia VIH-2-PC
2,986
> 3,000
no se puede calcular

VIH-2-PC_{PROMEDIO} > 0,500

Ejemplo: Absorbancia VIH-1 p24-PC
2,223
2,172
4,395

VIH-1 p24-PC_{PROMEDIO} = 4,395 / 2 = 2,198

El promedio de los valores de absorbancia de cada control positivo (Control positivo VIH-1; Control positivo VIH-2 y Control positivo VIH-1 p24) debe ser mayor de 0,500. Si el valor promedio es menor o igual a 0,500, el ensayo debe repetirse.

10.2. Cálculo del valor de corte

Valor de corte = NC_{PROMEDIO} + 0,170

Ejemplo: Valor de corte = 0,023 + 0,170 = 0,193

11. Interpretación de los resultados

- Las muestras con valores de absorbancia menores que el valor de corte se consideran como no reactivas según los criterios de este inmunoensayo y pueden considerarse negativas para los anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2 y negativas para el antígeno VIH-1 p24. No es necesario realizar pruebas adicionales.



- Las muestras con valores de absorbancia igual o mayor que el valor de corte se consideran como reactivas o positivas para los anticuerpos anti VIH-1 y/o VIH-2 ó el antígeno VIH-1 p24. Estas muestras (utilizando la muestra original) se deben volver a analizar en duplicado antes de la confirmación final del resultado.
- Las muestras inicialmente reactivas que no reaccionan en ninguna de las pruebas repetidas en duplicado, se consideran negativas para los anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2 y negativa para el antígeno VIH-1 p24. No es necesario realizar pruebas adicionales.
- Si uno o ambos valores de la prueba repetida son iguales o mayores que el valor de corte, se interpreta la muestra como repetidamente reactiva. Las muestras que son repetidamente reactivas, se interpretan como positivas para la presencia de anticuerpos anti VIH-1 y/o VIH-2 o el antígeno VIH-1 p24. En la mayoría de las situaciones es apropiado investigar las muestras repetidamente reactivas con pruebas adicionales más específicas.

Parámetro	No analizado	No reactivo en el HIV Ag/Ab ELISA (apDia)
HBSAg positivo	14	0
RF positivo	12	0
IgM CMV positivo	27	1
IgM TOXO positivo	8	1
IgM EBV positivo	12	1
Helicobacter pylori positivo	15	1
Malaria positivo	12	1
HAMA positivo	5	0
Lipémico	5	0
Bilirrubina	5	0
Hiper-proteína	5	0
Hiper-inmunoglobulina	5	0
Hemólisis	5	0
Biotina alta	5	0
Colesterol	5	0
Mujeres embarazadas 1 ^{er} semestre	5	0
Pacientes al azar hospitalizados	204	2
Total	349	7

12. Limitaciones del ensayo

- Es necesario adherirse estrictamente al protocolo y equipo recomendado para obtener resultados confiables en la prueba. Debe respetarse el pipeteo exacto de las muestras y los reactivos y los tiempos de lavado e incubación.
- Como en todas las pruebas de diagnóstico *in vitro*, no se debe realizar un diagnóstico clínico sólo en base a los resultados de una prueba individual. Para un diagnóstico final es necesario que un médico realice una completa evaluación.
- Debido a que no se ha utilizado un péptido grupo O VIH-1, la detección del grupo Q se basa únicamente en la reactividad cruzada de los anticuerpos del paciente a los antígenos VIH-1 gp41.

7 muestras resultaron positivas con este panel, resultando en una especificidad de $100 - (7/349 \times 100) = 98,0 \%$.

13. Rendimiento

La evaluación del rendimiento se ha realizado según las Especificaciones Técnicas Comunes 2009/886/EC.

13.1. Ejemplo de valores de DO esperadas

Controles	Valor DO esperado*
Control negativo, CTLNEG	0,048
Control positivo 1, CTLPOS1	2,850
Control positivo 2, CTLPOS2	>3,000
Control positivo 3, CTLPOS3	1,980

*Estos valores son sólo un ejemplo.

13.2. Especificidad diagnóstica

Suero y plasma humano normal

La especificidad se ha evaluado analizando 5061 muestras de donantes no seleccionados de origen belga y holandés. 22 muestras mostraron un resultado positivo, con una especificidad de 99.6%.

13.3. Interferencia en la especificidad

Se analizaron 145 muestras que potencialmente podían interferir y 204 pacientes al azar hospitalizados.

13.4. Sensibilidad clínica

Panel 1: muestras VIH-1 positivas (N° 400)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de Referencia VIH-1 positivo
Reactivo	400
No-reactivo	0
Total	400

Todas las muestras VIH-1 positivas se detectaron con el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: $100/100 \times 100 = 100,0 \%$

Panel 2: Muestras de infección VIH primaria (pre-seroconversión) (N° 50)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de referencia Infección VIH primaria
Reactivo	50
No-reactivo	0
Total	50

Todas las muestras con infección VIH primaria fueron detectadas por el HIV Ag/Ab ELISA, sensibilidad: $50/50 \times 100 = 100\%$.

Panel 3: Muestras VIH-1 positivas pertenecientes a subtipos diferentes (no-B)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de referencia VIH-1 positivo (subtipo no-B)
Reactivo	40
No-reactivo	0
Total	40

Todas las muestras VIH-1 no-B fueron detectadas por el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: $40/40 \times 100 = 100\%$.

13047
224

En detalle:

Muestra	Resultado ELISA VIH Ag/Ab (apDia)				Resultado del método de referencia	Resultado de referencia			Resultado de referencia
	DO	CO	DO/CO	reactivo		GAG	Subtipo ENV	POL	
1	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1	
2	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1	
3	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1	
4	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1	
5	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1	
6	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1	
7	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1	
8	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1	
9	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1	
10	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1	
11	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1	
12	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1	
13	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1	
14	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1	
15	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1	
16	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1	
17	3,00	0,24	12,15	reactivo	E	F	NT	VIH-1	
18	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1	
19	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1	
20	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1	
21	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1	
22	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1	
23	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1	
24	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1	
25	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1	
26	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	NT	CRF01_A	VIH-1	
27	3,00	0,24	12,15	reactivo	E	F	NT	VIH-1	
28	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	A	NT	VIH-1	
29	3,00	0,24	12,15	reactivo	Da	CRF01_A	NT	VIH-1	
30	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	D	NT	VIH-1	
31	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	D	NT	VIH-1	
32	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1	
33	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1	
34	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1	
35	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	A	NT	VIH-1	
36	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1	
37	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1	
38	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1	
39	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1	
40	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1	

Panel 4: Muestras VIH-2 positivas (Nº 100)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) resultado de la muestra	Resultados de referencia muestras VIH-2 positivas
Reactivo	100
No-reactivo	0
Total	100

Se detectaron todas las muestras VIH-2 positivas con el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: $100/100 \times 100 = 100\%$.

Panel 5: Sobrenadantes de cultivo celular

La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia pudo detectar los 50 sobrenadantes de cultivo celular. Todos los subtipos VIH-1, las cepas A, B, C, D, CRF01_AE, F, G, G/H, H, J, G/A, N y K fueron detectados al menos a una dilución o más en comparación con el ensayo de referencia (Vironostika VIH Uni-Form Ag/Ab) (sensibilidad analítica superior). La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia para el subtipo CRF02_AG detectó tres cepas a una dilución más alta y una cepa a una dilución más baja en comparación con la prueba de referencia. Una de las cuatro cepas del subtipo O fue detectada a la misma dilución, otra a una dilución más alta y dos a una dilución

HIV Ag/Ab ELISA

más baja. La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó todas las cepas subtipo A y subtipo B donde la prueba de referencia no pudo detectar ninguna cepa VIH-2.

En detalle:

Tipo	Subtipo	INNOTEST VIH Antígeno mAb	Vironostika VIH Uni-Form Ag/Ab	HIV Ag/Ab ELISA apDia
VIH-1	A/A	4/4	4/4	4/4
VIH-1	B/B	4/4	4/4	4/4
VIH-1	C/C	4/4	4/4	4/4
VIH-1	D/D	4/4	4/4	4/4
VIH-1	CRF01_AE	5/5	5/5	5/5
VIH-1	F/F	3/3	3/3	3/3
VIH-1	G/G	2/2	2/2	2/2
VIH-1	CRF02_AG	4/4	4/4	4/4
VIH-1	G/H	1/1	1/1	1/1
VIH-1	H/H	3/3	3/3	3/3
VIH-1	J/J	2/2	2/2	2/2
VIH-1	O/O	4/4	4/4	4/4
VIH-1	G/A	1/1	1/1	1/1
VIH-1	N	1/1	1/1	1/1
VIH-1	K	1/1	1/1	1/1
VIH-2	A	4/4	0/4	4/4
VIH-2	B	3/3	0/3	3/3
Total		50/50	43/50	50/50

Panel 6: Seroconversión

30 paneles de seroconversión se analizaron con HIV Ag/Ab ELISA de apDia, 20 de los cuales se analizaron en un laboratorio Belga de la OMS para VIH:

ID del Panel	Vironostika VIH Uni-Form II Ag/Ab	HIV Ag/Ab ELISA (apDia)
	Número de miembros positivos del panel/ total de números analizados	
PRB914-N	5/5	5/5
PRB916-P	3/6	3/6
PRB919-S	2/3	3/3
PRB924-X	4/8	4/8
PRB925-Y	2/6	2/6
PRB926-Z	3/6	4/6
PRB927-AB	4/5	4/5
PRB934-AI	3/3	3/3
PRB942-AR	1/4	1/4
PRB947-AW	3/4	3/4
PRB950-AZ	1/4	3/4
PRB951-BA	3/6	4/6
PRB952-BB	2/6	4/6
PRB953-BC	1/4	3/4
PRB954-BD	1/7	2/7
PRB955-BE	3/5	4/5
PRB956-BF	0/5	2/5
PRB957-BG	2/7	2/7
PRB958-BH	2/6	4/6
PRB959-BI	6/7	7/7
Puntaje total	51/107	67/107

Página 5/7

La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó un total de 67 de 107 miembros del panel, la prueba de referencia Vironostika VIH Uni-Form II Ag/Ab detectó 51 muestras.

En 11 de los 20 paneles de seroconversión la prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia pudo detectar al menos un miembro más del panel VIH-1 p24 positivo que la prueba de referencia. En nueve paneles de seroconversión adicionales HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó la misma cantidad de miembros del panel que la prueba de referencia.

13.5. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica para el antígeno VIH-1 p24 se evaluó utilizando el HIV Ag/Ab ELISA de apDia para analizar el Estándar Internacional NIBSC 90/636 para el antígeno VIH-1 p24.

NIBSC VIH-1 p24 IU/ml	HIV Ag/Ab ELISA (apDia)				Resultado del método de referencia DO/CO
	DO	CO	DO/CO	Resultado	
12,5	3,000	0,242	12,4	Reactivo	1,5
6,25	2,189	0,242	9,05	Reactivo	1,0
3,12	1,146	0,242	4,74	Reactivo	0,8
0,78	0,294	0,254	1,16	Reactivo	0,5
0,42	0,188	0,254	0,74	no-reactivo	0,3
0,21	0,115	0,254	0,45	no-reactivo	0,3

El antígeno VIH-1 p24 fue detectado por la prueba ELISA VIH-1 p24 de apDia en tres diluciones más altas comparado con el ensayo de referencia (sensibilidad analítica superior).

13.6. Precisión

En base a los valores S/CO de tres controles positivos y tres controles de valor de corte analizados 22 veces en un ensayo, se calculó la siguiente **variabilidad intra ensayo**:

Valores promedio (n = 22)	VIH-1 control positivo	VIH-1 valor de corte	VIH-2 control positivo	VIH-2 valor de corte	p24 control positivo	p24 valor de corte
S/CO	8,2	1,2	8,2	1,2	6,8	1,0
% CV	5,0	6,2	7,0	15,9	3,0	10,2

En base a los valores S/CO de tres controles positivos y tres controles de valor de corte analizados durante 20 días, cada vez en dos ensayos diferentes, se calculó la siguiente **variabilidad entre ensayos**:

Valores promedio (n = 40)	VIH-1 control positivo	VIH-1 valor de corte	VIH-2 control positivo	VIH-2 valor de corte	p24 control positivo	p24 valor de corte
S/CO	8,4	1,2	7,6	1,3	6,8	0,9
% CV	8,7	13,7	19,4	21,9	9,6	15,6

Referencias

Ly T.D., Martin L., Daghfal D., Sandridge A., West D., Bristow R., Chalouas L., Qiu X., Lou S.C., Hunt J.C., Schochetman G., Devare S.G. Seven Human Immunodeficiency (VIH) Antigen-Antibody Combination Assays: Evaluation of VIH Seroconversion Sensitivity and Subtype Detection. *J. Clin. Microbiol.*, Sept. 2001, 39:3122-3128.

Lawn S.D., Butera S.T., Folks T.M. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, Oct. 2001, 14:753-777.

Miedouge M., Grèze M., Bailly A., Izopet J. Analytical Sensitivity of four VIH combined Antigen/Antibody Assays using the p24 WHO standard. *J. Virol.*, 2011, 50:57-60.

Weber B., Gürtler L., Thorstensson R., Michl U., Mühlbacher A., Bürgisser P., Villaescusa R., Eiras A., Gabriel C., Stekel H., Tanprasert S., Oota S., Silvestre M.J., Marques C., Ladeira M., Rabenau H., Berger A., Schmitt U., Melchior W. Multicenter Evaluation of a new Automated Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay with a sensitive Antigen Detection Module and high Specificity. *J. Clin. Microbiol.*, June 2002, 40:1938-1946.

World Health Organization, Dept. Essential Health Technologies. VIH Assays : Operational Characteristics (Phase 1). Report 15 : Antigen/Antibody ELISAs. 2004 : 1-57.

Gold J, Dwyer J. A short history of AIDS. *Med. J. Aust.*, 1994, 160: 251-252.

Saville RD, Constantine NT, Cleghorn FR and Al. Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. *J. of Clin. Microbiol.*, July 2001: 2518-2524.

Novack L, Galai N, Yaari A, Orgel M, Shinar E, Sarov B. Use of Seroconversion Panels to estimate Delay in the detection of Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of pooled Compared to Singleton Serum Samples. *J. of Clin. Microbiol.*, Aug. 2006: 2909-2913.

Goudsmit J, Lange JM, Krone WJ, Teunissen MB, Epstein LG, Danner SA, van den Berg H, Breederveld C, Smit L, Bakker M, et al. Pathogenesis of VIH and its implications for serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy. *J. Virol. Methods.*, Aug. 1987, 17(1-2): 19-34.



apDia bvba, Raadsheerenstraat 3, B-2300 Turnhout, Bélgica
 Tel ++ 32 14 45 35 99 | Fax ++ 32 14 81 29 45
 E-mail admin@apdia.be
 Website www.apdiagroup.com

VIH96/05-2015-ES

[Handwritten signature]

Bloq. Hernán Stalino
 Co-Dirección Técnica
 1111 300
 ORBICION S.R.L.

13047
226

Resumen del procedimiento de la prueba



PASO	PROCEDIMIENTO
Paso de la muestra	Añada 100 µl de diluyente de la muestra. Añada 100 µl de muestra/control al diluyente y mezcle aspirando y dispensando con la pipeta. Analice los controles negativos y positivos en duplicado. Incubar 60 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 5x.
Conjugado 1	Añada 200 µl del Conjugado 1 listo para usar en los pocillos de la microplaca. Incuba 30 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 3x.
Conjugado 2	Añada 200 µl del Conjugado 2 diluido en los pocillos de la microplaca. Incuba 30 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 5x.
TMB/Sustrato	Añada 200 µl de TMB diluido en Solución de Sustrato en los pocillos de la microplaca.
Desarrollo del color	Incuba 30 minutos a 18-30°C. Proteja de la luz.
Parada	Añada 50 µl de Solución de parada y lea la DO a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm en un lector de microplacas ELISA.

Bloq. Hernán Stalino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.



INSTRUCCIONES PARA USO HIV Ag/Ab ELISA

REF 790001 **IVD** **CE** 0123 **2+2**

1. Uso previsto

El HIV Ag/Ab ELISA producido por apDia es un inmunoensayo enzimático cualitativo de 4ª generación de diagnóstico *in vitro* para la detección de anticuerpos contra VIH-1, VIH-2 y el antígeno VIH-1 p24. Todos los subtipos del VIH analizados se detectan, incluyendo subtipo O.

2. Antecedentes

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) consiste en un grupo de síntomas que resultan de la inhabilitación del sistema inmune humano causado por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). La infección del VIH puede evolucionar a la fase sintomática que se caracteriza por infecciones oportunistas que pueden causar la muerte.

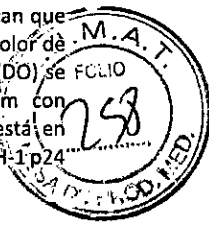
El agente etiológico del SIDA, el VIH, está dirigido a un tipo específico de células T, causando linfopenia y afectando la inmunidad mediada por células T. El VIH es un miembro de la familia de los retrovirus, con dos subgrupos familiares VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es más virulento y más transmisible que el VIH-2. El VIH-1 es el causante de las infecciones a nivel mundial, mientras que el VIH-2 se encuentra principalmente en los países de África occidental. Debido a que la reacción serológica cruzada entre VIH-1 y VIH-2 es muy variable y dependiente de la muestra analizada, se incluyen antígenos para la detección específica de VIH-1 y VIH-2 en el ensayo.

El VIH se transmite a través de contacto sexual con personas infectadas, por compartir agujas y jeringas con personas infectadas y por la transfusión de sangre contaminada. Los inmunoensayos enzimáticos (como el ensayo de 4ª generación HIV Ag/Ab ELISA de apDia) se recomiendan para detectar en sangre humana y plasma la presencia de anticuerpos anti VIH y antígeno VIH-1 p24.

3. Principio de la prueba

Los pocillos de la microplaca se recubren con antígenos que representan los epítopes de VIH-1 gp41 y VIH-2 gp36 en conjunto con anticuerpos monoclonales contra VIH-1 p24. Se añade suero o plasma en el pocillo, y si hay anticuerpos contra VIH-1 y/o VIH-2 (IgG, IgM o IgA) presentes en la muestra, se formarán complejos estables con los antígenos VIH unidos al pocillo. Si está presente el antígeno VIH-1 p24 se unirá a los anticuerpos en el pocillo y a los anticuerpos detectores presentes en el diluyente de la muestra. Los anticuerpos no reactivos se eliminan con el lavado. Los complejos antígeno-anticuerpo estables se identifican a través de la adición de antígenos biotinilados y de la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). Estos complejos antígeno-anticuerpo se cuantifican a través de la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano picante. Se añade

solución de sustrato de peroxidasa y se convierte en un producto de color azul. Una muestra positiva genera un color azul oscuro mientras que un color azul pálido o pocillos sin color, indican que es una muestra negativa. Al añadir solución de parada, el color de la solución cambia de azul a amarillo. La densidad óptica (DO) se mide con un espectrofotómetro (lector de ELISA) a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm y está en proporción con la cantidad de anticuerpos anti VIH-1/2 y VIH-1 p24 presentes en la muestra.



4. Componentes del Kit

Componente	Nombre indicado en el vial
2 microplacas (12 x 8 tiras) Recubierto con anticuerpos monoclonales anti VIH-1 p24, péptido específico VIH-1 gp41, proteína recombinante gp41 y péptido específico gp36 VIH-2	Tiras pre recubiertas MTP
1 vial, 1300 µl, listo para usar Combinación de suero o plasma humano negativo. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control negativo CTLNEG
1 vial, 1300 µl, listo para usar Control positivo para VIH-1. Contiene una combinación de sueros o plasmas positivos para VIH-1, inactivados, diluidos en una matriz proteica. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 1 CTLPOS1
1 vial, 1300 µl, listo para usar Control positivo para VIH-2. Contiene una combinación de sueros o plasmas positivos para VIH-2, inactivados, diluidos en una matriz proteica. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 2 CTLPOS2
1 vial, 1300 µl, listo para usar Control positivo para VIH p24. Contiene antígeno p24 recombinante diluido en una matriz proteica, concentración alrededor 100 pg/ml. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 3 CTLPOS3
1 botella, 25 ml, utilizar para diluir muestras Contiene anticuerpos monoclonales biotinilados anti VIH-1 p24. Contiene 0,05% Proclin 300.	Diluyente de la muestra DILSAM
1 botella, 50 ml, Lista para usar Contiene un péptido VIH-1 gp41 biotinilado específico, una proteína recombinante biotinilada gp41 y un péptido biotinilado VIH-2 específico gp36. Contiene 0,05% de Proclin 300.	Conjugado 1 CONJ1
1 vial, 500 µl, 100x Estreptavidina-HRP	Conjugado 2 CONJ2 100x
1 botella, 50 ml, utilizar para diluir conjugado 2 Contiene 0,05% Proclin 300.	Diluyente del conjugado 2 DILCONJ2
1 botella, 50 ml, utilizar para diluir TMB Contiene H ₂ O ₂ .	Tampón del sustrato DILTMB

30 477



1 vial, 500 µl, 100x Contiene 0,02% Thiomersal.	TMB TMB 100x
1 botella, 100 ml, 25x Contiene detergente en solución de tampón de fosfato. Contiene 0,17 % Proclin 300.	Solución de lavado WASH 25x
1 botella, 16 ml, listo para usar H ₂ SO ₄ 1M	Solución de parada STOP
6 selladores de placas	-

5. Materiales necesarios pero no suministrados

- Micropipetas de precisión calibradas
- Incubadora con termostato calibrada para incubar a 37 °C
- Agua de calidad EIA
- Agitador Vortex o similar
- Toallas de papel absorbente
- Lector de microplacas ELISA capaz de medir absorbancias a 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm

6. Advertencias y precauciones para los usuarios

- Solo para diagnóstico *in vitro*
- El kit debe ser utilizado por personal debidamente calificado en un entorno de laboratorio adecuado.
- Asegúrese de identificar las muestras debidamente. Anote la identificación de las muestras en la hoja de datos.
- Tratar los controles y las muestras como si tuvieran agentes infecciosos. El plasma o suero VIH positivo utilizados para preparar los controles, son negativos para HBsAg y VHC Ab y han sido inactivados con detergente como se describe en Horowitz B. et al., 1992, Blood: 826-831.
- El suero o plasma humano negativo utilizado en el control negativo, ha sido analizado y encontrado no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos anti VHC y anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2. Ya que ningún método conocido ofrece seguridad total que los productos derivados de sangre humana no transmitirán hepatitis u otras infecciones virales, se recomienda manipular este componente como si fuera un material potencialmente infeccioso.
- Elimine las muestras de los pacientes y todos los materiales utilizados para realizar esta prueba como si tuvieran agentes infecciosos.
- Use guantes desechables y ropa de protección al realizar un ensayo.
- La solución de parada es una solución de H₂SO₄ 1M que es irritante. En caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague con abundante agua y solicitar atención médica.
- No mezcle reactivos o microplacas recubiertas de kits con números de lote diferentes.
- Algunos componentes del kit contienen azida de sodio como conservante. Con el fin de evitar la formación de azidas metálicas potencialmente explosivas en las tuberías del laboratorio, deje fluir copiosa cantidad de agua por el desagüe después de eliminar estas soluciones.
- Informe al fabricante en caso de encontrar frascos/viales rotos ó componentes sellados/cerrados en forma inadecuada.

7. Condiciones de conservación

- Conserve el kit y sus componentes a 2-8 °C. No congele.
- Conserve las tiras de microplacas en su envase original con el desecante hasta que todas las tiras se hayan utilizado.
- Los componentes abiertos deben conservarse a 2-8°C hasta la próxima utilización y se pueden conservar por un mes.
- Para la conservación de los componentes reconstituidos consulte 9.2.
- No utilice ningún componente del kit después de la fecha de caducidad.

8. Toma de muestra y manipulación

- Se pueden utilizar muestras de suero, de plasma EDTA y de plasma citratado. Separar el suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar hemólisis; las muestras hemolizadas o lipémicas pueden producir resultados falsos.
- Manipular todas las muestras como si pudieran transmitir agentes patógenos.
- Conservar las muestras no diluidas a -20°C hasta su uso. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- No se recomienda conservar muestras diluidas ya que pueden afectar negativamente el rendimiento de la prueba.
- Mezclar la muestra antes de utilizar.

9. Procedimiento del ensayo

9.1. Observaciones generales

- Utilice una punta de pipeta desechable para cada transferencia de la muestra para evitar la contaminación cruzada.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de se uso. El envase de las microplacas se puede abrir si ha alcanzado la temperatura ambiente. Todos los reactivos se deben mezclar sin formar espuma.
- Una vez que el ensayo se ha iniciado, se deben completar todos los pasos sin interrupción.

9.2. Reconstitución de los reactivos

Preparar solo los volúmenes necesarios para realizar la prueba planificada.

- Solución de lavado: Diluya la solución de lavado concentrada 25x en agua destilada o desionizada. Asegúrese que los cristales de sal estén disueltos antes de preparar la dilución. Ejemplo: Añada 40 ml de solución de lavado 25x a 960 ml de agua desionizada. La solución de lavado diluida se puede conservar por 1 mes a 2-8 °C.
- Conjugado 2: Diluya el Conjugado 2 concentrado (100x) en diluyente del Conjugado 2. Ejemplo: Añada 250 µl de Conjugado 2 concentrado a 25 ml de diluyente del Conjugado 2. El Conjugado 2 diluido se puede conservar durante 5 días a 2-8 °C.
- Tampón TMB/Sustrato: Diluya el TMB concentrado (100x) en Tampón del sustrato. TMB100x es sólido a 4°C. Asegúrese que el TMB está completamente disuelto antes de preparar la dilución. Ejemplo: Añada 250 µl de TMB concentrado a 25 ml de tampón de sustrato.

El tampón TMB/sustrato diluido debe utilizarse dentro de 8 horas después de su preparación; siempre mantenga esta solución lejos de la luz.

9.3. Procedimiento de lavado

1 ciclo de lavado se realiza de la siguiente manera:

- Añada 400 µl de solución de lavado diluida en todos los pocillos utilizados en la microplaca.
- Retire la solución de lavado inmediatamente de los pocillos invirtiendo la microplaca y golpeándola para secarla sobre una toalla de papel.
- Se puede utilizar un lavador de microplacas automático pero será necesario adaptar el procedimiento de lavado. Si fuera necesario, aumente el número de ciclos e incluya un tiempo de remojo después de cada ciclo de lavado basado en los valores de las DO de los controles positivo y negativo. Se recomienda aumentar el tiempo de remojo en incrementos de 10 segundos, hasta 90 segundos. El número de ciclos de lavados puede gradualmente aumentarse, alternativamente o simultáneamente, p. ej. x7, x5, x7. Para obtener ayuda adicional con el procedimiento de lavado, contacte a apDia.

9.4. Procedimiento de la prueba

- Tome la cantidad necesaria de tiras de la prueba y devuelva las tiras no utilizadas al envase. En cada ensayo, programe una tira para los cuatro controles: se deben incluir un control negativo y tres controles positivos en duplicado.
- Añada 100 µl de diluyente de la muestra en cada pocillo.
- Añada 100 µl de muestra/controles, pipetear aspirando y dispensando para homogenizar y sellar las tiras con sellador de microplacas.
- Incube durante 60 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, agite las tiras vigorosamente para eliminar la solución. Lave la microplaca cinco ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de solución de Conjugado 1 en los pocillos. Selle las tiras con sellador de microplacas.
- Incube el Conjugado 1 durante 30 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, se elimina el Conjugado 1 invirtiendo la microplaca y golpeándola para secarla sobre una toalla de papel. Lave la microplaca por tres ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de la solución diluida del Conjugado 2 en los pocillos. Selle los pocillos con sellador de microplacas.
- Incube durante 30 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, elimine la solución de los pocillos y lave la microplaca cinco ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de la solución de TMB diluida en los pocillos de la microplaca.
- Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) protegido de la luz.
- Después de la incubación, añada 50 µl de la solución de parada y lea la DO a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm en un lector de microplacas dentro de 30 minutos después de detener la reacción. Se recomienda empezar a leer después de 10 minutos de añadir la solución de parada.

HIV Ag/Ab ELISA

10. Cálculo de los resultados

10.1. Validez

Los resultados de los controles deben estar dentro de los criterios de aceptación antes de poder interpretar cualquiera de los resultados de las muestras.

Cálculo del promedio del control negativo NC_{PROMEDIO}:

Ejemplo: Absorbancia NC
0,021
0,025
0,046
 $NC_{PROMEDIO} = 0,046 / 2 = 0,023$

El promedio de los valores de la absorbancia del control negativo debe ser menor que 0,100. Si el valor promedio es mayor o igual a 0,100, el ensayo debe repetirse.

Cálculo del promedio del control positivo PC_{PROMEDIO}:

Ejemplo: Absorbancia VIH-1-PC
1,545
1,239
2,784
 $VIH-1-PC_{PROMEDIO} = 2,784 / 2 = 1,392$

Ejemplo: Absorbancia VIH-2-PC
2,986
> 3,000
no se puede calcular
 $VIH-2-PC_{PROMEDIO} > 0,500$

Ejemplo: Absorbancia VIH-1 p24-PC
2,223
2,172
4,395
 $VIH-1 p24-PC_{PROMEDIO} = 4,395 / 2 = 2,198$

El promedio de los valores de absorbancia de cada control positivo (Control positivo VIH-1; Control positivo VIH-2 y Control positivo VIH-1 p24) debe ser mayor de 0,500. Si el valor promedio es menor o igual a 0,500, el ensayo debe repetirse.

10.2. Cálculo del valor de corte

Valor de corte = $NC_{PROMEDIO} + 0,170$

Ejemplo: Valor de corte = $0,023 + 0,170 = 0,193$

11. Interpretación de los resultados

- Las muestras con valores de absorbancia menores que el valor de corte se consideran como no reactivas según los criterios de este inmunoensayo y pueden considerarse negativas para los anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2 y negativas para el antígeno VIH-1 p24. No es necesario realizar pruebas adicionales.

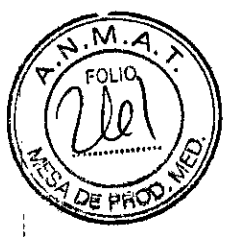
Bloq. Hernán Stalino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

Página 3/7



- Las muestras con valores de absorbancia igual o mayor que el valor de corte se consideran como reactivas o positivas para los anticuerpos anti VIH-1 y/o VIH-2 ó el antígeno VIH-1 p24. Estas muestras (utilizando la muestra original) se deben volver a analizar, en duplicado antes de la confirmación final del resultado.
- Las muestras inicialmente reactivas que no reaccionan en ninguna de las pruebas repetidas en duplicado, se consideran negativas para los anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2 y negativa para el antígeno VIH-1 p24. No es necesario realizar pruebas adicionales.
- Si uno o ambos valores de la prueba repetida son iguales o mayores que el valor de corte, se interpreta la muestra como repetidamente reactiva. Las muestras que son repetidamente reactivas, se interpretan como positivas para la presencia de anticuerpos anti VIH-1 y/o VIH-2 o el antígeno VIH-1 p24. En la mayoría de las situaciones es apropiado investigar las muestras repetidamente reactivas con pruebas adicionales más específicas.

Parámetro	No analizado	No reactivo en el HIV Ag/Ab ELISA (apDia)
HBSAg positivo	14	0
RF positivo	12	0
IgM CMV positivo	27	1
IgM TOXO positivo	8	1
IgM EBV positivo	12	1
Helicobacter pylori positivo	15	1
Malaria positivo	12	1
HAMA positivo	5	0
Lipémico	5	0
Bilirrubina	5	0
Hiper-proteína	5	0
Hiper-inmunoglobulina	5	0
Hemólisis	5	0
Biotina alta	5	0
Colesterol	5	0
Mujeres embarazadas 1 ^{er} semestre	5	0
Pacientes al azar hospitalizados	204	2
Total	349	7



12. Limitaciones del ensayo

- Es necesario adherirse estrictamente al protocolo y equipo recomendado para obtener resultados confiables en la prueba. Debe respetarse el pipeteo exacto de las muestras y los reactivos y los tiempos de lavado e incubación.
- Como en todas las pruebas de diagnóstico *in vitro*, no se debe realizar un diagnóstico clínico sólo en base a los resultados de una prueba individual. Para un diagnóstico final es necesario que un médico realice una completa evaluación.
- Debido a que no se ha utilizado un péptido grupo O VIH-1, la detección del grupo O se basa únicamente en la reactividad cruzada de los anticuerpos del paciente a los antígenos VIH-1 gp41.

7 muestras resultaron positivas con este panel, resultando en una especificidad de $100 - (7/349 \times 100) = 98,0 \%$.

13. Rendimiento

La evaluación del rendimiento se ha realizado según las Especificaciones Técnicas Comunes 2009/886/EC.

13.4. Sensibilidad clínica

Panel 1: muestras VIH-1 positivas (Nº 400)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de Referencia VIH-1 positivo
Reactivo	400
No-reactivo	0
Total	400

Todas las muestras VIH-1 positivas se detectaron con el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: $100/100 \times 100 = 100,0 \%$

13.1. Ejemplo de valores de DO esperadas

Controles	Valor DO esperado*
Control negativo, CTLNEG ¹	0,048
Control positivo 1, CTLPOS1	2,850
Control positivo 2, CTLPOS2	>3,000
Control positivo 3, CTLPOS3	1,980

*Estos valores son sólo un ejemplo.

Panel 2: Muestras de infección VIH primaria (pre-seroconversión) (Nº 50)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de referencia Infección VIH primaria
Reactivo	50
No-reactivo	0
Total	50

Todas las muestras con infección VIH primaria fueron detectadas por el HIV Ag/Ab ELISA, sensibilidad: $50/50 \times 100 = 100\%$.

13.2. Especificidad diagnóstica

Suero y plasma humano normal
La especificidad se ha evaluado analizando 5061 muestras de donantes no seleccionados de origen belga y holandés. 22 muestras mostraron un resultado positivo, con una especificidad de 99.6%.

Panel 3: Muestras VIH-1 positivas pertenecientes a subtipos diferentes (no-B)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de referencia VIH-1 positivo (subtipo no-B)
Reactivo	40
No-reactivo	0
Total	40

Todas las muestras VIH-1 no-B fueron detectadas por el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: $40/40 \times 100 = 100\%$.

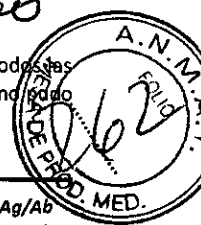
13.3. Interferencia en la especificidad

Se analizaron 145 muestras que potencialmente podían interferir y 204 pacientes al azar hospitalizados.

HIV Ag/Ab ELISA

Bloq. Hernán Slaño
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

Página 4/7



En detalle:

Muestra	Resultado ELISA VIH Ag/Ab (apDia)				Resultado del método de referencia			Resultado de referencia
	DO	CO	DO/CO	resultado	GAG	Subtipo ENV	POL	
1	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1
2	3,00	0,24	12,15	reactiva	A	A	NT	VIH-1
3	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1
4	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1
5	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
6	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
7	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
8	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
9	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
10	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
11	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
12	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
13	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
14	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
15	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
16	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
17	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
18	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1
19	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1
20	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1
21	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1
22	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1
23	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1
24	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1
25	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1
26	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1
27	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
28	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	F	NT	VIH-1
29	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	A	NT	VIH-1
30	3,00	0,24	12,15	reactivo	Da	CRF01_A	NT	VIH-1
31	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	D	NT	VIH-1
32	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1
33	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1
34	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1
35	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	A	NT	VIH-1
36	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1
37	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1
38	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1
39	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1
40	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1
41	3,00	0,24	12,15	reactiva	NT	NT	K	VIH-1

Panel 4: Muestras VIH-2 positivas (N° 100)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) resultado de la muestra	Resultados de referencia muestras VIH-2 positivas
Reactivo	100
No-reactivo	0
Total	100

Se detectaron todas las muestras VIH-2 positivas con el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: 100/100 X 100 = 100%.

Panel 5: Sobrenadantes de cultivo celular

La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia pudo detectar los 50 sobrenadantes de cultivo celular. Todos los subtipos VIH-1, las cepas A, B, C, D, CRF01_AE, F, G, G/H, H, J, G/A, N y K fueron detectados al menos a una dilución o más en comparación con el ensayo de referencia (Vironostika VIH Uni-Form Ag/Ab) (sensibilidad analítica superior). La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia para el subtipo CRF02_AG detectó tres cepas a una dilución más alta y una cepa a una dilución más baja en comparación con la prueba de referencia. Una de las cuatro cepas del subtipo O fue detectada a la misma dilución, otra a una dilución más alta y dos a una dilución

HIV Ag/Ab ELISA

más baja. La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó todas las cepas subtipo A y subtipo B donde la prueba de referencia no pudo detectar ninguna cepa VIH-2.

En detalle:

Tipo	Subtipo	INNOTEST VIH Antígeno mAb	Vironostika VIH Uni-Form Ag/Ab	HIV Ag/Ab ELISA apDia
VIH-1	A/A	4/4	4/4	4/4
VIH-1	B/B	4/4	4/4	4/4
VIH-1	C/C	4/4	4/4	4/4
VIH-1	D/D	4/4	4/4	4/4
VIH-1	CRF01_AE	5/5	5/5	5/5
VIH-1	F/F	3/3	3/3	3/3
VIH-1	G/G	2/2	2/2	2/2
VIH-1	CRF02_AG	4/4	4/4	4/4
VIH-1	G/H	1/1	1/1	1/1
VIH-1	H/H	3/3	3/3	3/3
VIH-1	J/J	2/2	2/2	2/2
VIH-1	O/O	4/4	4/4	4/4
VIH-1	G/A	1/1	1/1	1/1
VIH-1	N	1/1	1/1	1/1
VIH-1	K	1/1	1/1	1/1
VIH-2	A	4/4	0/4	4/4
VIH-2	B	3/3	0/3	3/3
Total		50/50	43/50	50/50

Panel 6: Seroconversión

30 paneles de seroconversión se analizaron con HIV Ag/Ab ELISA de apDia, 20 de los cuales se analizaron en un laboratorio Belga de la OMS para VIH:

ID del Panel	Vironostika VIH Uni-Form II Ag/Ab	HIV Ag/Ab ELISA (apDia)
	Número de miembros positivos del panel / total de números analizados	
PRB914-N	5/5	5/5
PRB916-P	3/6	3/6
PRB919-S	2/3	3/3
PRB924-X	4/8	4/8
PRB925-Y	2/6	2/6
PRB926-Z	3/6	4/6
PRB927-AB	4/5	4/5
PRB934-AI	3/3	3/3
PRB942-AR	1/4	1/4
PRB947-AW	3/4	3/4
PRB950-AZ	1/4	3/4
PRB951-BA	3/6	4/6
PRB952-BB	2/6	4/6
PRB953-BC	1/4	3/4
PRB954-BD	1/7	2/7
PRB955-BE	3/5	4/5
PRB956-BF	0/5	2/5
PRB957-BG	2/7	2/7
PRB958-BH	2/6	4/6
PRB959-BI	6/7	7/7
Puntaje total	51/107	67/107

La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó un total de 67 de 107 miembros del panel, la prueba de referencia Vironostika VIH Uni-Form II Ag/Ab detectó 51 muestras.

En 11 de los 20 paneles de seroconversión la prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia pudo detectar al menos un miembro más del panel VIH-1 p24 positivo que la prueba de referencia. En nueve paneles de seroconversión adicionales HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó la misma cantidad de miembros del panel que la prueba de referencia.

13.5. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica para el antígeno VIH-1 p24 se evaluó utilizando el HIV Ag/Ab ELISA de apDia para analizar el Estándar Internacional NIBSC 90/636 para el antígeno VIH-1 p24.

NIBSC VIH-1 p24 IU/ml	HIV Ag/Ab ELISA (apDia)				Resultado del método de referencia
	DO	CO	DO/CO	Resultado	DO/CO
12,5	3,000	0,242	12,4	Reactivo	1,5
6,25	2,189	0,242	9,05	Reactivo	1,0
3,12	1,146	0,242	4,74	Reactivo	0,8
0,78	0,294	0,254	1,16	Reactivo	0,5
0,42	0,188	0,254	0,74	no-reactivo	0,3
0,21	0,115	0,254	0,45	no-reactivo	0,3

El antígeno VIH-1 p24 fue detectado por la prueba ELISA VIH-1 p24 de apDia en tres diluciones más altas comparado con el ensayo de referencia (sensibilidad analítica superior).

13.6. Precisión

En base a los valores S/CO de tres controles positivos y tres controles de valor de corte analizados 22 veces en un ensayo, se calculó la siguiente **variabilidad intra ensayo**:

Valores promedio (n = 22)	VIH-1 control positivo	VIH-1 control valor corte	VIH-2 control positivo	VIH-2 control valor corte	p24 control positivo	p24 control valor corte
S/CO	8,2	1,2	8,2	1,2	6,8	1,0
% CV	5,0	6,2	7,0	15,9	3,0	10,2

En base a los valores S/CO de tres controles positivos y tres controles de valor de corte analizados durante 20 días, cada vez en dos ensayos diferentes, se calculó la siguiente **variabilidad entre ensayos**:

Valores promedio (n = 40)	VIH-1 control positivo	VIH-1 valor de corte	VIH-2 control positivo	VIH-2 valor de corte	p24 control positivo	p24 valor de corte
S/CO	8,4	1,2	7,6	1,3	6,8	0,9
% CV	8,7	13,7	19,4	21,9	9,6	15,6

Referencias

Ly T.D., Martin L., Daghfal D., Sandridge A., West D., Bristow R., Chakras L., Qiu X., Lou S.C., Hunt J.C., Schochetman G., Devare S.G. Seven Human Immunodeficiency (VIH) Antigen-Antibody Combination Assays Evaluation of VIH Seroconversion Sensitivity and Subtype Detection. J. Clin. Microbiol., Sept. 2001, 39:3122-3128.

Lawn S.D., Butera S.T., Folks T.M. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Clin. Microbiol. Rev., Oct. 2001, 14:753-777.

Miedouge M., Grèze M., Bailly A., Izopet J. Analytical Sensitivity of four VIH combined Antigen/Antibody Assays using the p24 WHO standard. J. Clin. Virol., 2011, 50:57-60.

Weber B., Gürtler L., Thorstensson R., Michl U., Mühlbacher A., Bürgisser P., Villaescusa R., Eiras A., Gabriel C., Stekel H., Tanprasert S., Oota S., Silvestre M.J., Marques C., Ladeira M., Rabenau H., Berger A., Schmitt U., Melchior W. Multicenter Evaluation of a new Automated Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay with a sensitive Antigen Detection Module and high Specificity. J. Clin. Microbiol., June 2002, 40:1938-1946.

World Health Organization, Dept. Essential Health Technologies. VIH Assays : Operational Characteristics (Phase 1). Report 15 : Antigen/Antibody ELISAs. 2004 : 1-57.

Gold J, Dwyer J. A short history of AIDS. Med. J. Aust., 1994, 160: 251-252.

Saville RD, Constantine NT, Cleghorn FR and Al. Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. J. of Clin. Microbiol., July 2001: 2518-2524.

Novack L, Galai N, Yaari A, Orgel M, Shinar E, Sarov B. Use of Seroconversion Panels to estimate Delay in the detection of Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of pooled Compared to Singleton Serum Samples. J. of Clin. Microbiol., Aug. 2006: 2909-2913.

Goudsmit J, Lange JM, Krone WJ, Teunissen MB, Epstein LG, Danner SA, van den Berg H, Breederveld C, Smit L, Bakker M, et al. Pathogenesis of VIH and its implications for serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy. J. Virol. Methods., Aug. 1987, 17(1-2): 19-34.



apDia bvba, Raadsherenstraat 3, B-2300 Turnhout, Bélgica
 Tel ++ 32 14 45 35 99 | Fax ++ 32 14 81 29 45
 E-mail admin@apdia.be
 Website www.apdiagroup.com

VIH192/05-2015-ES

Bloq. Hernán Stalino
 Co-Dirección Técnica
 M. N. 7899
 CROMOION S.R.L.

Resumen del procedimiento de la prueba

3027



PASO	PROCEDIMIENTO
Paso de la muestra	Añada 100 µl de diluyente de la muestra. Añada 100 µl de muestra/control al diluyente y mezcle aspirando y dispensando con la pipeta. Analice los controles negativos y positivos en duplicado. Incubar 60 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 5x.
Conjugado 1	Añada 200 µl del Conjugado 1 listo para usar en los pocillos de la microplaca. Incuba 30 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 3x.
Conjugado 2	Añada 200 µl del Conjugado 2 diluido en los pocillos de la microplaca. Incuba 30 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 5x.
TMB/Sustrato	Añada 200 µl de TMB diluido en Solución de Sustrato en los pocillos de la microplaca.
Desarrollo del color	Incuba 30 minutos a 18-30°C. Proteja de la luz.
Parada	Añada 50 µl de Solución de parada y lea la DO a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm en un lector de microplacas ELISA.

E

Bioq. Hernán Sialino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

H
E
13047
~~263~~

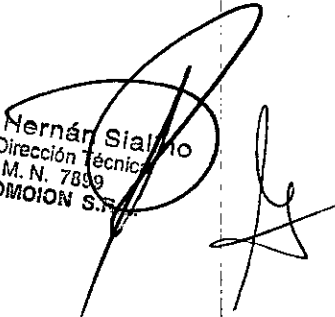


Manual de instrucciones

Ref 790005 – Equipo por 480 determinaciones

E

Bloq. Hernán Sialvo
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.





INSTRUCCIONES PARA USO HIV Ag/Ab ELISA

REF 790005

IVD

CE 0123

2°C

1. Uso previsto

El HIV Ag/Ab ELISA producido por apDia es un inmunoensayo enzimático cualitativo de 4ª generación de diagnóstico *in vitro* para la detección de anticuerpos contra VIH-1, VIH-2 y el antígeno VIH-1 p24. Todos los subtipos del VIH analizados se detectan, incluyendo subtipo O.

2. Antecedentes

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) consiste en un grupo de síntomas que resultan de la inhabilitación del sistema inmune humano causado por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). La infección del VIH puede evolucionar a la fase sintomática que se caracteriza por infecciones oportunistas que pueden causar la muerte.

El agente etiológico del SIDA, el VIH, está dirigido a un tipo específico de células T, causando linfopenia y afectando la inmunidad mediada por células T. El VIH es un miembro de la familia de los retrovirus, con dos subgrupos familiares VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es más virulento y más transmisible que el VIH-2. El VIH-1 es el causante de las infecciones a nivel mundial, mientras que el VIH-2 se encuentra principalmente en los países de África occidental. Debido a que la reacción serológica cruzada entre VIH-1 y VIH-2 es muy variable y dependiente de la muestra analizada, se incluyen antígenos para la detección específica de VIH-1 y VIH-2 en el ensayo.

El VIH se transmite a través de contacto sexual con personas infectadas, por compartir agujas y jeringas con personas infectadas y por la transfusión de sangre contaminada. Los inmunoensayos enzimáticos (como el ensayo de 4ª generación HIV Ag/Ab ELISA de apDia) se recomiendan para detectar en sangre humana y plasma la presencia de anticuerpos anti VIH y antígeno VIH-1 p24.

3. Principio de la prueba

Los pocillos de la microplaca se recubren con antígenos que representan los epítopes de VIH-1 gp41 y VIH-2 gp36 en conjunto con anticuerpos monoclonales contra VIH-1 p24. Se añade suero o plasma en el pocillo, y si hay anticuerpos contra VIH-1 y/o VIH-2 (IgG, IgM o IgA) presentes en la muestra, se formarán complejos estables con los antígenos VIH unidos al pocillo. Si está presente el antígeno VIH-1 p24 se unirá a los anticuerpos en el pocillo y a los anticuerpos detectores presentes en el diluyente de la muestra. Los anticuerpos no reactivos se eliminan con el lavado. Los complejos antígeno-anticuerpo estables se identifican a través de la adición de antígenos biotinilados y de la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). Estos complejos antígeno-anticuerpo se cuantifican a través de la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano picante. Se añade

solución de sustrato de peroxidasa y se convierte en un producto de color azul. Una muestra positiva genera un color azul oscuro mientras que un color azul pálido o pocillos sin color, indican que es una muestra negativa. Al añadir solución de parada, el color de la solución cambia de azul a amarillo. La densidad óptica (DO) se mide con un espectrofotómetro (lector de ELISA) a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm y está en proporción con la cantidad de anticuerpos anti VIH-1/2 y VIH-1 p24 presentes en la muestra.



4. Componentes del Kit

Componente	Nombre indicado en el vial
5 microplacas (12 x 8 tiras) Recubierto con anticuerpos monoclonales anti VIH-1 p24, péptido específico VIH-1 gp41, proteína recombinante gp41 y péptido específico gp36 VIH-2	Tiras pre recubiertas MTP
1 vial, 3000 µl, listo para usar Combinación de suero o plasma humano negativo. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control negativo CTLNEG
1 vial, 3000 µl, listo para usar Control positivo para VIH-1. Contiene una combinación de sueros o plasmas positivos para VIH-1, inactivados, diluidos en una matriz proteica. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 1 CTLPOS1
1 vial, 3000 µl, listo para usar Control positivo para VIH-2. Contiene una combinación de sueros o plasmas positivos para VIH-2, inactivados, diluidos en una matriz proteica. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 2 CTLPOS2
1 vial, 3000 µl, listo para usar Control positivo para VIH p24. Contiene antígeno p24 recombinante diluido en una matriz proteica, concentración alrededor 100 pg/ml. Contiene 0,09% NaN ₃ .	Control positivo 3 CTLPOS3
1 botella, 60 ml, utilizar para diluir muestras Contiene anticuerpos monoclonales biotinilados anti VIH-1 p24. Contiene 0,05% Proclin 300.	Diluyente de la muestra DILSAM
1 botella, 120 ml, lista para usar Contiene un péptido VIH-1 gp41 biotinilado específico, una proteína recombinante biotinilada gp41 y un péptido biotinilado VIH-2 específico gp36. Contiene 0,05% de Proclin 300.	Conjugado 1 CONJ1
1 vial, 1200 µl, 100x Estreptavidina-HRP	Conjugado 2 CONJ2 100x
1 botella, 120 ml, utilizar para diluir conjugado 2 Contiene 0,05% Proclin 300.	Diluyente del conjugado 2 DILCONJ2
1 botella, 120 ml, utilizar para diluir TMB Contiene H ₂ O ₂ .	Tampón del sustrato DILTMB

130 475

207

1 vial, 1200 µl, 100x	TMB
Contiene 0,02% Thiomersal.	TMB 100x
2 botellas, 120 ml, 25x	Solución de lavado
Contiene detergente en solución de tampón de fosfato.	WASH 25x
Contiene 0,17 % Proclin 300.	Solución de parada
1 botella, 30 ml, listo para usar	STOP
H ₂ SO ₄ 1M	
15 selladores de placas	

5. Materiales necesarios pero no suministrados

- Micropipetas de precisión calibradas
- Incubadora con termostato calibrada para incubar a 37 °C
- Agua de calidad EIA
- Agitador Vortex o similar
- Toallas de papel absorbente
- Lector de microplacas ELISA capaz de medir absorbancias a 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm

6. Advertencias y precauciones para los usuarios

- Solo para diagnóstico *in vitro*
- El kit debe ser utilizado por personal debidamente calificado en un entorno de laboratorio adecuado.
- Asegúrese de identificar las muestras debidamente. Anote la identificación de las muestras en la hoja de datos.
- Tratar los controles y las muestras como si tuvieran agentes infecciosos. El plasma o suero VIH positivo utilizados para preparar los controles, son negativos para HBsAg y VHC Ab y han sido inactivados con detergente como se describe en Horowitz B. et al., 1992, Blood: 826-831.
- El suero o plasma humano negativo utilizado en el control negativo, ha sido analizado y encontrado no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos anti VHC y anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2. Ya que ningún método conocido ofrece seguridad total que los productos derivados de sangre humana no transmitirán hepatitis u otras infecciones virales, se recomienda manipular este componente como si fuera un material potencialmente infeccioso.
- Elimine las muestras de los pacientes y todos los materiales utilizados para realizar esta prueba como si tuvieran agentes infecciosos.
- Use guantes desechables y ropa de protección al realizar un ensayo.
- La solución de parada es una solución de H₂SO₄ 1M que es irritante. En caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague con abundante agua y solicitar atención médica.
- No mezcle reactivos o microplacas recubiertas de kits con números de lote diferentes.
- Algunos componentes del kit contienen azida de sodio como conservante. Con el fin de evitar la formación de azidas metálicas potencialmente explosivas en las tuberías del laboratorio, deje fluir copiosa cantidad de agua por el desagüe después de eliminar estas soluciones.
- Informe al fabricante en caso de encontrar frascos/viales rotos ó componentes sellados/cerrados en forma inadecuada.

7. Condiciones de conservación

- Conserve el kit y sus componentes a 2-8 °C. No congele.
- Conserve las tiras de microplacas en su envase original con el desecante hasta que todas las tiras se hayan utilizado.
- Los componentes abiertos deben conservarse a 2-8°C hasta la próxima utilización y se pueden conservar por un mes.
- Para la conservación de los componentes reconstituidos consulte 9.2.
- No utilice ningún componente del kit después de la fecha de caducidad.

8. Toma de muestra y manipulación

- Se pueden utilizar muestras de suero, de plasma EDTA y de plasma citratado. Separar el suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar hemólisis; las muestras hemolizadas o lipémicas pueden producir resultados falsos.
- Manipular todas las muestras como si pudieran transmitir agentes patógenos.
- Conservar las muestras no diluidas a -20°C hasta su uso. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- No se recomienda conservar muestras diluidas ya que pueden afectar negativamente el rendimiento de la prueba.
- Mezclar la muestra antes de utilizar.

9. Procedimiento del ensayo

9.1. Observaciones generales

- Utilice una punta de pipeta desechable para cada transferencia de la muestra para evitar la contaminación cruzada.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de ser usados. El envase de las microplacas se puede abrir si ha alcanzado la temperatura ambiente. Todos los reactivos se deben mezclar sin formar espuma.
- Una vez que el ensayo se ha iniciado, se deben completar todos los pasos sin interrupción.

9.2. Reconstitución de los reactivos

Preparar solo los volúmenes necesarios para realizar la prueba planificada.

- Solución de lavado: Diluya la solución de lavado concentrada 25x en agua destilada o desionizada. Asegúrese que los cristales de sal estén disueltos antes de preparar la dilución. **Ejemplo:** Añada 40 ml de solución de lavado 25x a 960 ml de agua desionizada. La solución de lavado diluida se puede conservar por 1 mes a 2-8 °C.
- Conjugado 2: Diluya el Conjugado 2 concentrado (100x) en diluyente del Conjugado 2. **Ejemplo:** Añada 250 µl de Conjugado 2 concentrado a 25 ml de diluyente del Conjugado 2. El Conjugado 2 diluido se puede conservar durante 5 días a 2-8 °C.
- Tampón TMB/Sustrato: Diluya el TMB concentrado (100x) en Tampón del sustrato. TMB100x es sólido a 4°C. Asegúrese que el TMB está completamente disuelto antes de preparar la dilución. **Ejemplo:** Añada 250 µl de TMB concentrado a 25 ml de tampón de sustrato.

3047
266

El tampón TMB/sustrato diluido debe utilizarse dentro de 8 horas después de su preparación; siempre mantenga esta solución lejos de la luz.

9.3. Procedimiento de lavado

1 ciclo de lavado se realiza de la siguiente manera:

- Añada 400 µl de solución de lavado diluida en todos los pocillos utilizados en la microplaca.
- Retire la solución de lavado inmediatamente de los pocillos invirtiendo la microplaca y golpeándola para secarla sobre una toalla de papel.
- Se puede utilizar un lavador de microplacas automático pero será necesario adaptar el procedimiento de lavado. Si fuera necesario, aumente el número de ciclos e incluya un tiempo de remojo después de cada ciclo de lavado basado en los valores de las DO de los controles positivo y negativo. Se recomienda aumentar el tiempo de remojo en incrementos de 10 segundos, hasta 90 segundos. El número de ciclos de lavados puede gradualmente aumentarse, alternativamente o simultáneamente, p. ej. x7, x5, x7. Para obtener ayuda adicional con el procedimiento de lavado, contacte a apDia.

9.4. Procedimiento de la prueba

- Tome la cantidad necesaria de tiras de la prueba y devuelva las tiras no utilizadas al envase. En cada ensayo, programe una tira para los cuatro controles: se deben incluir un control negativo y tres controles positivos en duplicado.
- Añada 100 µl de diluyente de la muestra en cada pocillo.
- Añada 100 µl de muestra/controles, pipetear aspirando y dispensando para homogenizar y sellar las tiras con sellador de microplacas.
- Incube durante 60 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, agite las tiras vigorosamente para eliminar la solución. Lave la microplaca cinco ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de solución de Conjugado 1 en los pocillos. Selle las tiras con sellador de microplacas.
- Incube el Conjugado 1 durante 30 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, se elimina el Conjugado 1 invirtiendo la microplaca y golpeándola para secarla sobre una toalla de papel. Lave la microplaca por tres ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de la solución diluida del Conjugado 2 en los pocillos. Selle los pocillos con sellador de microplacas.
- Incube durante 30 minutos a 37°C.
- Después de la incubación, elimine la solución de los pocillos y lave la microplaca cinco ciclos según el procedimiento de lavado (9.3).
- Añada 200 µl de la solución de TMB diluida en los pocillos de la microplaca.
- Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) protegido de la luz.
- Después de la incubación, añada 50 µl de la solución de parada y lea la DO a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm en un lector de microplacas dentro de 30 minutos después de detener la reacción. Se recomienda empezar a leer después de 10 minutos de añadir la solución de parada.

10. Cálculo de los resultados

248

10.1. Validez

Los resultados de los controles deben estar dentro de los criterios de aceptación antes de poder interpretar cualquiera de los resultados de las muestras.

Cálculo del promedio del control negativo NC_{PROMEDIO}:

Ejemplo: Absorbancia NC
 0,021
 0,025
 0,046
 NC_{PROMEDIO} = 0,046 / 2 = 0,023

El promedio de los valores de la absorbancia del control negativo debe ser menor que 0,100. Si el valor promedio es mayor o igual a 0,100, el ensayo debe repetirse.

Cálculo del promedio del control positivo PC_{PROMEDIO}:

Ejemplo: Absorbancia VIH-1-PC
 1,545
 1,239
 2,784
 VIH-1-PC_{PROMEDIO} = 2,784 / 2 = 1,392

Ejemplo: Absorbancia VIH-2-PC
 2,986
 > 3,000
 no se puede calcular

VIH-2-PC_{PROMEDIO} > 0,500

Ejemplo: Absorbancia VIH-1 p24-PC
 2,223
 2,172
 4,395
 VIH-1 p24-PC_{PROMEDIO} = 4,395 / 2 = 2,198

El promedio de los valores de absorbancia de cada control positivo (Control positivo VIH-1; Control positivo VIH-2 y Control positivo VIH-1 p24) debe ser mayor de 0,500. Si el valor promedio es menor o igual a 0,500, el ensayo debe repetirse.

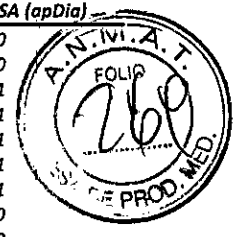
10.2. Cálculo del valor de corte

Valor de corte = NC_{PROMEDIO} + 0,170

Ejemplo: Valor de corte = 0,023 + 0,170 = 0,193

11. Interpretación de los resultados

- Las muestras con valores de absorbancia menores que el valor de corte se consideran como no reactivas según los criterios de este inmunoensayo y pueden considerarse negativas para los anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2 y negativas para el antígeno VIH-1 p24. No es necesario realizar pruebas adicionales.



- Las muestras con valores de absorbancia igual o mayor que el valor de corte se consideran como reactivas o positivas para los anticuerpos anti VIH-1 y/o VIH-2 ó el antígeno VIH-1 p24. Estas muestras (utilizando la muestra original) se deben volver a analizar en duplicado antes de la confirmación final del resultado.
- Las muestras inicialmente reactivas que no reaccionan en ninguna de las pruebas repetidas en duplicado, se consideran negativas para los anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2 y negativa para el antígeno VIH-1 p24. No es necesario realizar pruebas adicionales.
- Si uno o ambos valores de la prueba repetida son iguales o mayores que el valor de corte, se interpreta la muestra como repetidamente reactiva. Las muestras que son repetidamente reactivas, se interpretan como positivas para la presencia de anticuerpos anti VIH-1 y/o VIH-2 o el antígeno VIH-1 p24. En la mayoría de las situaciones es apropiado investigar las muestras repetidamente reactivas con pruebas adicionales más específicas.

Parámetro	No analizado	No reactivo en el HIV Ag/Ab ELISA (apDia)
HBsAg positivo	14	0
RF positivo	12	0
IgM CMV positivo	27	1
IgM TOXO positivo	8	1
IgM EBV positivo	12	1
Helicobacter pylori positivo	15	1
Malaria positivo	12	1
HAMA positivo	5	0
Lipémico	5	0
Bilirrubina	5	0
Hiper-proteína	5	0
Hiper-inmunoglobulina	5	0
Hemólisis	5	0
Biotina alta	5	0
Colesterol	5	0
Mujeres embarazadas 1 ^{er} semestre	5	0
Pacientes al azar hospitalizados	204	2
Total	349	7

12. Limitaciones del ensayo

- Es necesario adherirse estrictamente al protocolo y equipo recomendado para obtener resultados confiables en la prueba. Debe respetarse el pipeteo exacto de las muestras y los reactivos y los tiempos de lavado e incubación.
- Como en todas las pruebas de diagnóstico *in vitro*, no se debe realizar un diagnóstico clínico sólo en base a los resultados de una prueba individual. Para un diagnóstico final es necesario que un médico realice una completa evaluación.
- Debido a que no se ha utilizado un péptido grupo O VIH-1, la detección del grupo O se basa únicamente en la reactividad cruzada de los anticuerpos del paciente a los antígenos VIH-1 gp41.

7 muestras resultaron positivas con este panel, resultando en una especificidad de $100 - (7/349 \times 100) = 98,0\%$.

13. Rendimiento

La evaluación del rendimiento se ha realizado según las Especificaciones Técnicas Comunes 2009/886/EC.

13.4. Sensibilidad clínica

Panel 1: muestras VIH-1 positivas (Nº 400)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de Referencia VIH-1 positivo
Reactivo	400
No-reactivo	0
Total	400

Todas las muestras VIH-1 positivas se detectaron con el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: $100/100 \times 100 = 100,0\%$

Panel 2: Muestras de infección VIH primaria (pre-seroconversión) (Nº 50)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de referencia Infección VIH primaria
Reactivo	50
No-reactivo	0
Total	50

Todas las muestras con infección VIH primaria fueron detectadas por el HIV Ag/Ab ELISA, sensibilidad: $50/50 \times 100 = 100\%$.

Panel 3: Muestras VIH-1 positivas pertenecientes a subtipos diferentes (no-B)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) Resultado de la prueba	Resultados de referencia VIH-1 positivo (subtipo no-B)
Reactivo	40
No-reactivo	0
Total	40

Todas las muestras VIH-1 no-B fueron detectadas por el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: $40/40 \times 100 = 100\%$.

13.1. Ejemplo de valores de DO esperadas

Controles	Valor DO esperado*
Control negativo, CTLNEG	0,048
Control positivo 1, CTLPOS1	2,850
Control positivo 2, CTLPOS2	>3,000
Control positivo 3, CTLPOS3	1,980

*Estos valores son sólo un ejemplo.

13.2. Especificidad diagnóstica

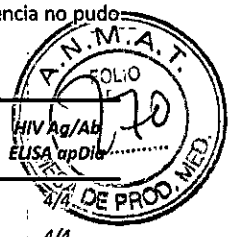
Suero y plasma humano normal

La especificidad se ha evaluado analizando 5061 muestras de donantes no seleccionados de origen belga y holandés. 22 muestras mostraron un resultado positivo, con una especificidad de 99.6%.

13.3. Interferencia en la especificidad

Se analizaron 145 muestras que potencialmente podían interferir y 204 pacientes al azar hospitalizados.

268 13047



En detalle:

Muestra	Resultado ELISA VIH Ag/Ab (apDia)			Resultado de referencia	Resultado del método de referencia			Resultado de referencia
	DO	CO	DO/CO		GAG	Subtipo ENV	POL	
1	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1
2	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1
3	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1
4	3,00	0,24	12,15	reactivo	A	A	NT	VIH-1
5	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
6	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
7	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
8	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	C	NT	VIH-1
9	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
10	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
11	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
12	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	D	NT	VIH-1
13	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
14	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
15	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	CRF01_A	NT	VIH-1
16	3,00	0,24	12,15	reactivo	E	E	NT	VIH-1
17	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1
18	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1
19	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	F	NT	VIH-1
20	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1
21	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1
22	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	G	NT	VIH-1
23	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1
24	3,00	0,24	12,15	reactivo	H	H	NT	VIH-1
25	3,00	0,24	12,15	reactivo	CRF01_A	NT	CRF01_A	VIH-1
26	3,00	0,24	12,15	reactivo	D	F	NT	VIH-1
27	3,00	0,24	12,15	reactivo	C	A	NT	VIH-1
28	3,00	0,24	12,15	reactivo	Du	CRF01_A	NT	VIH-1
29	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	D	NT	VIH-1
30	3,00	0,24	12,15	reactivo	F	D	NT	VIH-1
31	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1
32	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1
33	3,00	0,24	12,15	reactivo	O	O	NT	VIH-1
34	3,00	0,24	12,15	reactivo	G	A	NT	VIH-1
35	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1
36	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1
37	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	J	VIH-1
38	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1
39	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1
40	3,00	0,24	12,15	reactivo	NT	NT	K	VIH-1

más baja. La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó todos las cepas subtipo A y subtipo B donde la prueba de referencia no pudo detectar ninguna cepa VIH-2.

En detalle:

Tipo	Subtipo	INNOTEST VIH Antígeno mAb	Vironostika VIH Uni-Form Ag/Ab	HIV Ag/Ab ELISA apDia
VIH-1	A/A	4/4	4/4	
VIH-1	B/B	4/4	4/4	4/4
VIH-1	C/C	4/4	4/4	4/4
VIH-1	D/D	4/4	4/4	4/4
VIH-1	CRF01_AE	5/5	5/5	5/5
VIH-1	F/F	3/3	3/3	3/3
VIH-1	G/G	2/2	2/2	2/2
VIH-1	CRF02_AG	4/4	4/4	4/4
VIH-1	G/H	1/1	1/1	1/1
VIH-1	H/H	3/3	3/3	3/3
VIH-1	I/I	2/2	2/2	2/2
VIH-1	O/O	4/4	4/4	4/4
VIH-1	G/A	1/1	1/1	1/1
VIH-1	N	1/1	1/1	1/1
VIH-1	K	1/1	1/1	1/1
VIH-2	A	4/4	0/4	4/4
VIH-2	B	3/3	0/3	3/3
Total		50/50	43/50	50/50

Panel 6: Seroconversión

30 paneles de seroconversión se analizaron con HIV Ag/Ab ELISA de apDia, 20 de los cuales se analizaron en un laboratorio Belga de la OMS para VIH:

ID del Panel	Vironostika VIH Uni-Form II Ag/Ab	HIV Ag/Ab ELISA (apDia)
	Número de miembros positivos del panel / total de números analizados	
PRB914-N	5/5	5/5
PRB916-P	3/6	3/6
PRB919-S	2/3	3/3
PRB924-X	4/8	4/8
PRB925-Y	2/6	2/6
PRB926-Z	3/6	4/6
PRB927-AB	4/5	4/5
PRB934-AI	3/3	3/3
PRB942-AR	1/4	1/4
PRB947-AW	3/4	3/4
PRB950-AZ	1/4	3/4
PRB951-BA	3/6	4/6
PRB952-BB	2/6	4/6
PRB953-BC	1/4	3/4
PRB954-BD	1/7	2/7
PRB955-BE	3/5	4/5
PRB956-BF	0/5	2/5
PRB957-BG	2/7	2/7
PRB958-BH	2/6	4/6
PRB959-BI	6/7	7/7
Puntaje total	51/107	67/107

Panel 4: Muestras VIH-2 positivas (Nº 100)

HIV Ag/Ab ELISA (apDia) resultado de la muestra	Resultados de referencia muestras VIH-2 positivas
Reactivo	100
No-reactivo	0
Total	100

Se detectaron todas las muestras VIH-2 positivas con el HIV Ag/Ab ELISA de apDia, sensibilidad: 100/100 X 100 = 100%.

Panel 5: Sobrenadantes de cultivo celular

La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia pudo detectar los 50 sobrenadantes de cultivo celular. Todos los subtipos VIH-1, las cepas A, B, C, D, CRF01_AE, F, G, G/H, H, J, G/A, N y K fueron detectados al menos a una dilución o más en comparación con el ensayo de referencia (Vironostika VIH Uni-Form Ag/Ab) (sensibilidad analítica superior). La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia para el subtipo CRF02_AG detectó tres cepas a una dilución más alta y una cepa a una dilución más baja en comparación con la prueba de referencia. Una de las cuatro cepas del subtipo O fue detectada a la misma dilución, otra a una dilución más alta y dos a una dilución

La prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó un total de 67 de 107 miembros del panel, la prueba de referencia Vironostika VIH Uni-Form II Ag/Ab detectó 51 muestras.

En 11 de los 20 paneles de seroconversión la prueba HIV Ag/Ab ELISA de apDia pudo detectar al menos un miembro más del panel VIH-1 p24 positivo que la prueba de referencia. En nueve paneles de seroconversión adicionales HIV Ag/Ab ELISA de apDia detectó la misma cantidad de miembros del panel que la prueba de referencia.

13.5. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica para el antígeno VIH-1 p24 se evaluó utilizando el HIV Ag/Ab ELISA de apDia para analizar el Estándar Internacional NIBSC 90/636 para el antígeno VIH-1 p24.

NIBSC VIH-1 p24 IU/ml	HIV Ag/Ab ELISA (apDia)				Resultado del método de referencia DO/CO
	DO	CO	DO/CO	Resultado	
12,5	3,000	0,242	12,4	Reactivo	1,5
6,25	2,189	0,242	9,05	Reactivo	1,0
3,12	1,146	0,242	4,74	Reactivo	0,8
0,78	0,294	0,254	1,15	Reactivo	0,5
0,42	0,188	0,254	0,74	no-reactivo	0,3
0,21	0,115	0,254	0,45	no-reactivo	0,3

El antígeno VIH-1 p24 fue detectado por la prueba ELISA VIH-1 p24 de apDia en tres diluciones más altas comparado con el ensayo de referencia (sensibilidad analítica superior).

13.6. Precisión

En base a los valores S/CO de tres controles positivos y tres controles de valor de corte analizados 22 veces en un ensayo, se calculó la siguiente **variabilidad intra ensayo**:

Valores promedio (n = 22)	VIH-1 control positivo	VIH-1 control valor corte	VIH-2 control positivo	VIH-2 control valor corte	p24 control positivo	p24 control valor corte
S/CO	8,2	1,2	8,2	1,2	6,8	1,0
% CV	5,0	6,2	7,0	15,9	3,0	10,2

En base a los valores S/CO de tres controles positivos y tres controles de valor de corte analizados durante 20 días, cada vez en dos ensayos diferentes, se calculó la siguiente **variabilidad entre ensayos**:

Valores promedio (n = 40)	VIH-1 control positivo	VIH-1 valor de corte	VIH-2 control positivo	VIH-2 valor de corte	p24 control positivo	p24 valor de corte
S/CO	8,4	1,2	7,6	1,3	6,8	0,9
% CV	8,7	13,7	19,4	21,9	9,6	15,6

Referencias

Ly T.D., Martin L., Dagfal D., Sandridge A., West D., Bristow R., Chalouas L., Qiu X., Lou S.C., Hunt J.C., Schochetman G., Devare S.G. Seven Human Immunodeficiency (VIH) Antigen-Antibody Combination Assays: Evaluation of VIH Seroconversion Sensitivity and Subtype Detection. J. Clin. Microbiol., Sept. 2001, 39:3122-3128.

Lawn S.D., Butera S.T., Folks T.M. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Clin. Microbiol. Rev., Oct. 2001, 14:753-777.

Miedouge M., Grèze M., Bailly A., Izopet J. Analytical Sensitivity of four VIH combined Antigen/Antibody Assays using the p24 WHO standard. J. Clin. Virol., 2011, 50:57-60.

Weber B., Gürtler L., Thorstensson R., Michl U., Mühlbacher A., Bürgisser P., Villaescusa R., Eiras A., Gabriel C., Stekel H., Tanprasert S., Oota S., Silvestre M.J., Marques C., Ladeira M., Rabenau H., Berger A., Schmitt U., Melchior W. Multicenter Evaluation of a new Automated Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay with a sensitive Antigen Detection Module and high Specificity. J. Clin. Microbiol., June 2002, 40:1938-1946.

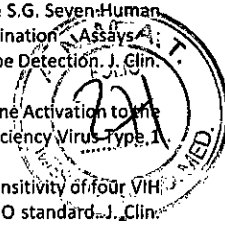
World Health Organization, Dept. Essential Health Technologies. VIH Assays : Operational Characteristics (Phase 1). Report 15 : Antigen/Antibody ELISAs. 2004 : 1-57.

Gold J, Dwyer J. A short history of AIDS. Med. J. Aust., 1994, 160: 251-252.

Saville RD, Constantine NT, Cleghorn FR and Al. Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. J. of Clin. Microbiol., July 2001: 2518-2524.

Novack L, Galai N, Yaari A, Orgel M, Shinar E, Sarov B. Use of Seroconversion Panels to estimate Delay in the detection of Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of pooled Compared to Singleton Serum Samples. J. of Clin. Microbiol., Aug. 2006: 2909-2913.

Goudsmit J, Lange JM, Krone WJ, Teunissen MB, Epstein LG, Danner SA, van den Berg H, Breederveld C, Smit L, Bakker M, et al. Pathogenesis of VIH and its implications for serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy. J. Virol. Methods., Aug. 1987, 17(1-2): 19-34.



apDia bvba, Raadsherenstraat 3, B-2300 Turnhout, Bélgica
Tel ++ 32 14 45 35 99 | Fax ++ 32 14 81 29 45
E-mail admin@apdia.be
Website www.apdiagroup.com

VIH480/05-2015-ES

Bioq. Hernán Sialino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

13047
270

Resumen del procedimiento de la prueba



PASO	PROCEDIMIENTO
Paso de la muestra	Añada 100 µl de diluyente de la muestra. Añada 100 µl de muestra/control al diluyente y mezcle aspirando y dispensando con la pipeta. Analice los controles negativos y positivos en duplicado. Incubar 60 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 5x.
Conjugado 1	Añada 200 µl del Conjugado 1 listo para usar en los pocillos de la microplaca. Incuba 30 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 3x.
Conjugado 2	Añada 200 µl del Conjugado 2 diluido en los pocillos de la microplaca. Incuba 30 minutos a 37°C.
Paso de lavado	Realice el paso de lavado 5x.
TMB/Sustrato	Añada 200 µl de TMB diluido en Solución de Sustrato en los pocillos de la microplaca.
Desarrollo del color	Incuba 30 minutos a 18-30°C. Proteja de la luz.
Parada	Añada 50 µl de Solución de parada y lea la DO a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600-650 nm en un lector de microplacas ELISA.

C

Bloq. Hernán Sialino
Co-Dirección Técnica
M. N. 7899
CROMOION S.R.L.

4304



HIV Ag/Ab ELISA
Ref: 790000



XX/XXXX



XX/XXXX



MTP		1 x 96
CTLNEG		1 x 0,65 ml
CTLPOS1		1 x 0,65 ml
CTLPOS2		1 x 0,65 ml
CTLPOS3		1 x 0,65 ml
DILSAM		1 x 12 ml
CONJ1		1 x 25 ml
CONJ2	100 x	1 x 0,25 ml
DILCONJ2		1 x 25 ml
DILTMB		1 x 25 ml
TMB	100 x	1 x 0,25 ml
WASH	25 x	1 x 50 ml
STOP		1 x 12 ml

4th gen Enzyme Immuno Assay for the *in vitro* diagnostic screening in human serum or plasma of antibodies to HIV-1, HIV-2 and HIV P24 antigen



CE 0123

HIV96/07-2013

IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR: PROMODIN S.R.L.
 Operto 6125 (C1406CEA) C.A.B.A. - Argentina
 Tel./Fax (011) 4544-3205/06
 Legajo empresa: 908
 Director Técnico: Dra. Cecilia Amaboldi
 Producto Médico - Venta exclusiva a Laboratorios de Análisis Clínicos
 Uso Diagnóstico *In Vitro*
 Certif. / PM:
 Autorizado por la ANMAT
 Ministerio de Salud - República Argentina
 VER INSTRUCCIONES DE USO

Dr. Hernán Stalino
Co-Director Técnico
M. N. 1009
CROMODIN S.R.L.

13047




oDia bvba

Handwerkershof 3
 2300 Beersel Belgium
 T +32 14 45 29 00
 F +32 14 81 29 45
 www.opdia.be



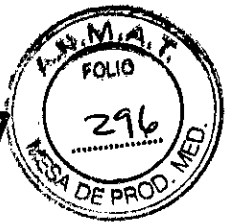
oDia bvba

Handwerkershof 3
 2300 Beersel Belgium
 T +32 14 45 29 00
 F +32 14 81 29 45
 www.opdia.be

E

Bioq. Hornán Sáling
 Co-Dirección Técnica
 M.N. 7882

93047



HIV Ag/Ab ELISA
Ref. 790001

LOT xx/xxxx xx/xxxx Σ 192T

MTP		2 x 96
CTLNEG		1 x 1,3 ml
CTLPOS1		1 x 1,3 ml
CTLPOS2		1 x 1,3 ml
CTLPOS3		1 x 1,3 ml
DILSAM		1 x 25 ml
CONJ1		1 x 50 ml
CONJ2	100 x	1 x 0,5 ml
DILCONJ2		1 x 50 ml
DILTMB		1 x 50 ml
TMB	100 x	1 x 0,5 ml
WASH	25 x	1 x 60 ml
STOP		1 x 16 ml



HIV192/11-2011

IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR: CROMOION S.R.L.
Operto 5125 (C1408CEA) C.A.B.A - Argentina
Tel./Fax (011) 4644-3205/06
Legajo empresa: 908
Directora Técnica: Dra. Cecilia Amadori
Producto Médico - Venta exclusiva a Laboratorios de Análisis Clínicos
Uso Diagnóstico In Vitro

Certif. / PM:

Autorizado por la ANMAT
Ministerio de Salud - República Argentina
VER INSTRUCCIONES DE USO

Dr. Martín Gialino
Co-Director Técnica
M.N. 1038
CROMOION S.R.L.

- 130



 **oDia** b.v.b.a.

Wouterweerd 3
 2300 Ransbeek, Belgium
 T +32 14 45 25 99
 F +32 14 81 29 45
 www.opdia.be



 **oDia** b.v.b.a.

Wouterweerd 3
 2300 Ransbeek, Belgium
 T +32 14 45 25 99
 F +32 14 81 29 45
 www.opdia.be

E

Sergio Hernán Galino
 Co-Dirección Técnica
 M. N. 7299
 CROQUIS S.R.L.



13047

HIV Ag/Ab ELISA
Ref. 790005

LOT

xx/xxxx



xx/xxxx

Σ 480T

MTP		5 x 96
CTLNEG		1 x 3 ml
CTLPOS1		1 x 3 ml
CTLPOS2		1 x 3 ml
CTLPOS3		1 x 3 ml
DILSAM		1 x 60 ml
CONJ1		1 x 120 ml
CONJ2	100 x	1 x 1,2 ml
DILCONJ2		1 x 120 ml
DILTMB		1 x 120 ml
TMB	100 x	1 x 1,2 ml
WASH	25 x	1 x 120 ml
STOP		1 x 30 ml



CE
0123

HIV480/11-2011

IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR: CROMOION S.R.L.
 Operto 6125 (C1408CEA) C.A.B.A. - Argentina
 Tel./Fax (011) 4044-3203/06
 Legajo empresa: 908
 Directora Técnica: Dra. Cecilia Amabotti
 Producto Médico - Venta exclusiva a Laboratorios de Análisis Clínicos
 Uso Diagnóstico In Vitro
 Certif. / PM
 Autorizado por: la ANMAT
 Ministerio de Salud - República Argentina
 VER INSTRUCCIONES DE USO

E

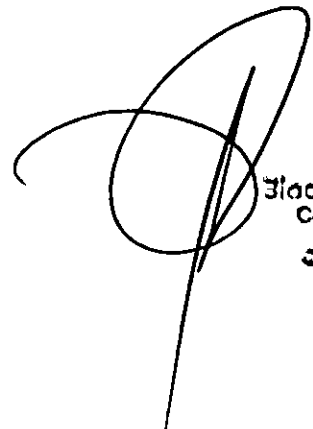
[Signature]
 Bloque de...
 1. H. 2003
 CROMOION S.R.L.

M.A.T.
30
MESA DE

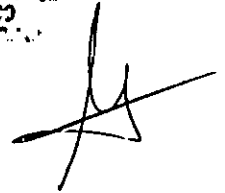
 **oDia** b.v.b.a.
Rue de l'Industrie 1
2300 Herestraat Belgium
T +32 14 45 35 99
F +32 14 81 29 45
www.opdia.be

 **oDia** b.v.b.a.
Rue de l'Industrie 1
2300 Herestraat Belgium
T +32 14 45 35 99
F +32 14 81 29 45
www.opdia.be

E



Blaq. Hernán Estalino
Co-Dirección Técnica
M.N. 7092





Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A.N. M. A.T

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-3110-3022/15-6

Se autoriza a la firma CROMOION S.R.L. a importar y comercializar el Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado HIV Ag-Ab ELISA / INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO CUALITATIVO DE 4ª GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VIH-1, VIH-2 Y EL ANTÍGENO p24 DE VIH-1. En envases conteniendo:-----

	96 Determinaciones	192 Determinaciones	480 Determinaciones
MICROPLACA	1 x 12 TIRAS x 8 POCILLOS	2 x 12 TIRAS x 8 POCILLOS	5 x 12 TIRAS x 8 POCILLOS
CONTROL NEGATIVO	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
CONTROL POSITIVO 1	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
CONTROL POSITIVO 2	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
CONTROL POSITIVO 3	1 vial x 650 µl	1 vial x 1300 µl	1 vial x 3000 µl
DILUYENTE DE MUESTRA	1 x 12 ml	1 x 25 ml	1 x 60 ml
CONJUGADO 1	1 x 25 ml	1 x 50 ml	1 x 120 ml
CONJUGADO 2 100x	1 vial x 250 µl	1 vial x 500 µl	1 vial x 1200 µl
DILUYENTE DEL CONJUGADO 2	1 x 25 ml	1 x 50 ml	1 x 120 ml
TAMPON DEL SUSTRATO	1 x 25 ml	1 x 50 ml	1 x 120 ml
SUSTRATO TMB	1 vial x 250 µl	1 vial x 500 µl	1 vial x 1200 µl
SOLUCIÓN DE LAVADO	1 x 50 ml	1 x 100 ml	2 x 120 ml
SOLUCIÓN DE STOP	1 x 12 ml	1 x 16 ml	1 x 30 ml

Vida útil: VEINTIDOS (22) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8 °C. Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley Nº 16.463 y Resolución

Ministerial Nº 145/98. Lugar de elaboración: ADVANCED

PRACTICAL DIAGNOSTICS BVBA - ApDia. Raadsherenstraat 3, B - 2300 Turnhout. (BELGICA). En las etiquetas de los envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado n° **008501**

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA

Buenos Aires,

29 NOV. 2016

Firma y sello

Dr. ROBERTO LEDE
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.