

INSTRUÇÕES DE USO

CAMBRIDGE BIOTECH HIV-1 WESTERN BLOT KIT

Para detecção de Anticorpos anti- HIV-1

Código REM: 02OR0045K1

Código do Fabricante: 98002

NOME E INTENÇÕES DE USO

O Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit é um teste qualitativo “in vitro” para detecção e identificação de anticorpos do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em soro ou plasma humano.

Este teste é indicado para uso como um teste adicional mais específico, em amostras de soro ou plasma humano repetidamente positivas utilizando procedimentos de triagem tais como ELISA, em pessoas com risco desconhecido.

É também utilizado como um teste específico adicional a ser usado com amostras de soro ou plasma originárias de indivíduos reativos usando testes rápido de HIV-1.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A técnica de “Western blot”^{1,2}, tem sido utilizada para detectar anticorpos para o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), reconhecido como o agente etiológico da Síndrome de Imunodeficiência Humana adquirida (AIDS)^{3,4}. A combinação de separação eletroforética de misturas complexas de antígenos com a alta sensibilidade da técnica de imunoblotting tem sido útil na caracterização dos antígenos de HIV-1 e na descrição da resposta imune a esses vírus em pessoas expostas ou infectadas.

O Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit, quando usado como indicado nesta bula, irá detectar anticorpos anti-HIV-1 quando presentes em soro ou plasma humano. A posição das bandas na tira de nitrocelulose permite que a reatividade desses anticorpos seja associada com antígenos virais específicos.

Pessoas demonstrando anticorpos anti-HIV-1 devem ser encaminhadas para avaliação médica, que pode incluir testes que utilizem outras técnicas. Um diagnóstico clínico de AIDS só pode ser feito se a pessoa se encaixar na definição de AIDS estabelecida pelo CDC⁴.

PRINCÍPIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO PROCEDIMENTO

O Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit é fabricado pela Maxim Biomedical Coporation a partir de HIV-1 cultivado em linfócitos T células H9/HTLV-III⁵. O vírus parcialmente purificado é inativado por tratamento com psoralen e luz ultravioleta, e ruptura por detergente. Proteínas específicas do HIV-1 são fracionadas de acordo com seu peso molecular, por eletroforese em um bloco de gel de poliacrilamida, na presença de duodecilsulfato de sódio (SDS). As proteínas de HIV-1 separadas são eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose previamente lavada, bloqueada (para diminuir a ligação de imunoglobulinas inespecíficas), e embaladas. Tiras de nitrocelulose são incubadas individualmente com amostras de soro ou plasma humano ou controles. Durante a incubação, se os anticorpos para HIV-1 estiverem presentes na amostra, se ligarão aos antígenos virais ligados às tiras. As tiras são novamente lavadas para remover materiais que não se ligaram. A visualização imunoglobulinas humanas especificamente ligadas às proteínas de HIV-1 é dada *in situ* usando uma série de reações com anti-IgG humana de cabra conjugada com biotina, avidina conjugada com peroxidase eqüina (HRP) e substrato, 4-cloro-1-naftol. Se na amostra houver presença de anticorpos contra qualquer um dos principais antígenos de HIV-1, em concentração suficiente, serão vistas na tira de nitrocelulose bandas correspondentes a posição de uma ou mais das seguintes proteínas (p) ou glicoproteínas (gp) : p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120, gp160 (os números referem-se ao peso molecular aproximado em kilodaltons).

REAGENTES

Reagentes do Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit :

- (NITROCELULOSE STRIPS) TIRAS DE NITROCELULOSE - cada tira de nitrocelulose contém proteínas antigênicas separadas, ligadas de HIV-1 parcialmente purificadas e inativadas, em quantidade suficiente para detectar anticorpos humanos. Proteínas bovinas estão presentes como agente bloqueador. As tiras são consecutivamente numeradas (de 1 a 27).
- (NON-REACTIVE CONTROL) CONTROLE NÃO REAGENTE – Soro humano normal não reagente para anti HIV-1 e antígeno de superfície de hepatite B. Contém 0.1% de azida sódica e 0.005% de timerosal como conservantes.
- (WEAKLY REACTIVE CONTROL) CONTROLE FRACAMENTE REAGENTE - Soro humano inativado com baixo título de anticorpos para HIV-1 e não reagente para antígenos de superfície de hepatite B. Contém 0.1% de azida sódica e 0.005% de timerosal como conservantes.
- (STRONGLY REACTIVE CONTROL) CONTROLE FORTEMENTE REAGENTE - Soro humano inativado com alto título de anticorpos para antígeno de HIV-1 e não reagente para antígeno de superfície de hepatite B. Contém 0.1% de azida sódica e 0.005% de timerosal como conservantes.
- (WASH BUFFER) TAMPÃO DE LAVAGEM – fornecido 20 X concentrado. Quando diluído contém 0.02 M de tris , 0.1 M NaCl, 0.3% de Tween 20 e 0.005% de timerosal como conservante, pH 7.4.
- (BLOTTING BUFFER) TAMPÃO BLOTTING – fornecido 10 X concentrado. Quando diluído contém 0.02 M de tris , 0.1 M NaCl, soro de cabra normal inativada pelo calor e 0.01% de timerosal como conservante, pH 7.4.
- (CONJUGATE 1) CONJUGADO 1 – anticorpos anti-IgG humana de cabra biotilada (cadeias leve e pesada). Contém 0.002% de timerosal como conservante.
- (CONJUGATE 2) CONJUGADO 2 – avidina conjugada com peroxidase eqüina. Contém 0.01% de timerosal como conservante.
- (SUBSTRATE A) SUBSTRATO A – 7.8 mM de solução de 4-cloro-1-naftol em solução alcoólica.
- (SUBSTRATE B) SUBSTRATO B – solução aquosa de peróxido de hidrogênio (0.02%) em tampão citrato.
- (BLOTTING POWDER) PÓ DE BLOTTING – leite desnatado em pó.

CUIDADOS

1. MANIPULAR AS AMOSTRAS, TIRAS E CONTROLES REAGENTES E NÃO REAGENTES COMO PASSÍVEIS DE TRANSMITIR AGENTES INFECCIOSOS. Antígenos inativados de HIV-1 sofreram eletroforese e foram transferidos para nitrocelulose. OS CONTROLES REATIVOS FRACOS E FORTES foram inativados pelo calor. E ainda, o plasma utilizado para produzir os Controles mostrou-se não-reagente para antígeno de superfície de hepatite B. Entretanto nenhum método de testagem conhecido atualmente pode assegurar que os produtos derivados de sangue humano não irão transmitir agentes infectantes. **Portanto, estes componentes devem ser tratados como passíveis de transmitir agentes infecciosos.**

2. Não pipetar com a boca.

3. Usar luvas descartáveis durante o procedimento do teste. Descartar as luvas como lixo infectante. Lavar completamente as mãos após o uso dos reagentes.

4. Secar os respingos rapidamente com uma solução 1% de hipoclorito de sódio (1:5 diluição de água sanitária líquida). Materiais contaminados devem ser descartados como lixo infectante.

5. Descartar todos os materiais utilizados no Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit e amostras como lixo infectante. O método recomendado de descarte é autoclavagem por no mínimo 1 hora a 121° C. Os materiais descartados podem ser incinerados. Misture os descartes líquidos com solução de igual volume de hipoclorito de sódio a 5% (água sanitária líquida), por pelo menos 60 minutos para desinfecção.

6. Não permita que o SUBSTRATO, especialmente 4-cloro-1-naftol entre em contato com a pele. Se o contato ocorrer lave com água.

7. Os CONTROLES contém azida sódica como conservante. Se estes materiais, tanto concentrados como diluídos, tiverem que ser descartados em pia com encanamento de chumbo, lave com grandes quantidades de água para prevenir o acúmulo de substâncias potencialmente explosivas.

Além disso, consulte o manual “Saved Management No. CDC – 22, Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts” (Center for Disease Control, Atlanta, GA, April 30, 1976).

8. Evite o uso de instrumentos de metal em contato com SUBSTRATO B e a solução de trabalho do substrato, pois os metais podem causar redução em H₂O₂.

PRECAUÇÕES

AVISO: O FDA licenciou este kit para uso com soro ou plasma. O uso deste kit com outras amostras que não especificamente aprovadas para uso com este kit pode dar resultados imprecisos.

1. NÃO TROCAR REAGENTES DE KITS DE LOTES DIFERENTES.

2. Não usar os kits após seu vencimento. A validade está impressa nas caixas dos kits.

3. Evitar contaminação dos reagentes quando abrir e retirar alíquotas dos frascos primários. Mantenha todos os reagentes refrigerados (2 a 8 °C), quando não estiverem em uso.

4. Não trocar as tampas dos frascos, isto poderá ocasionar contaminação cruzada dos reagentes. Designar recipientes específicos para reagentes específicos.

5. Amostras ou tiras muito contaminadas podem resultar o aparecimento de manchas pretas nas tiras , que não devem ser interpretadas. Atenção especial deve ser dada a armazenagem das amostras e kits para evitar este problema.

6. Proteja a SOLUÇÃO DE TRABALHO DO SUBSTRATO da luz durante a preparação e use dentro de 30 minutos após a mistura.

7. Deve-se utilizar água destilada ou deionizada para diluir os reagentes para evitar substâncias que possam interferir no ensaio.

8. Não remova as TIRAS DE NITROCELULOSE da embalagem até imediatamente antes do uso. Para prevenir condensação no tubo das tiras, abra-o apenas APÓS as tiras terem atingido a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos). Feche o tubo imediatamente após remover as tiras que serão usadas.

9. Deixar que os componentes atinjam a temperatura ambiente antes do uso (aproximadamente 30 minutos).

10. Usar somente os CONTROLES fornecidos com o kit.

11. NÃO CORTAR AS TIRAS. Tiras estreitas podem causar erros de interpretação, pois as tiras podem virar durante a incubação, ou artefatos nas zonas de reação podem ser confundidos com possíveis bandas ou podem mascarar o reconhecimento de bandas positivas.

12. Meça todos os reagentes. Seja extremamente cuidadoso e use pipetas calibradas e aferidas de boa qualidade quando preparar SOLUÇÕES DE TRABALHO DO CONJUGADO.

13. Descarte a solução descontaminante antes da preparação do substrato.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

ATENÇÃO: Deixe os reagentes alcançarem a temperatura ambiente antes de usar. (Aproximadamente 30 minutos)

1. TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO

(a) Diluir 1 parte de TAMPÃO DE LAVAGEM (20X) com 19 partes de água grau reagente. Misture bem.

(b) Tampão de Lavagem diluído pode ser armazenado em temperatura ambiente por 3 meses.

2. TAMPÃO DE TRABALHO DO BLOTTING

(a) O Tampão de trabalho do blotting deve ser preparado e usado até 5 dias.

(b) Dilua 1 parte do Tampão de blotting (10X) com 9 partes de água grau reagente. Misture bem.

(c) Use 1.0 g de Pó de blotting por 20 mL de preparado de Tampão de blotting diluído no passo 2b acima. Misture até dissolver o pó por completo. Se o kit inteiro for ser usado em cinco dias, adicione 9.0 g a 180 mL do Tampão de blotting diluído. Armazene de 2-8 °C.

3. SOLUÇÃO DE TRABALHO DO CONJUGADO 1

(a) Recorra às INSTRUÇÕES SUPLEMENTARES para uma diluição apropriada do CONJUGADO 1 fornecido com o kit.

(b) A SOLUÇÃO DE TRABALHO DO CONJUGADO1 deve ser preparado pouco tempo antes do uso.

4. SOLUÇÃO DE TRABALHO DO CONJUGADO 2

- a) Recorra às INSTRUÇÕES SUPLEMENTARES para uma diluição apropriada do CONJUGADO 2 fornecido com o kit.
- b) A SOLUÇÃO DE TRABALHO DO CONJUGADO 2 **deve ser preparada pouco tempo antes do uso.**

5. SOLUÇÃO DE TRABALHO DO SUBSTRATO

- a) A SOLUÇÃO DE TRABALHO DO SUBSTRATO **deve ser preparada pouco tempo antes do uso.**
- b) Prepare a SOLUÇÃO DE TRABALHO DO SUBSTRATO pela mistura de partes iguais de SUBSTRATO A e SUBSTRATO B. Misture bem.

Reagentes necessários (em mL)* para diversos números de tiras.

	NÚMEROS DE TIRAS						
	1	3	6	9	15	20	27
Tampão de lavagem diluído	20.0	60.0	120.0	180.0	300.0	400.0	540.0
Pó de blotting	0.3 g	0.9 g	1.8 g	2.7 g	4.5 g	6.0 g	8.1 g
Tampão de trabalho do blotting	6.0	18.0	36.0	54.0	90.0	120.0	162.0
Solução de trabalho do conjugado 1**	2.0	6.0	12.0	18.0	30.0	40.0	54.0
Solução de trabalho do conjugado 2**	2.0	6.0	12.0	18.0	30.0	40.0	54.0
Substrato A	1.0	3.0	6.0	9.0	15.0	20.0	27.0
Substrato B	1.0	3.0	6.0	9.0	15.0	20.0	27.0

* Volumes mínimos. Prepare um ligeiro excesso de cada solução para compensar perdas durante a pipetagem.

** Veja Instruções suplementares para Cálculo da Diluição.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM

- Armazene os kits HIV-1 Western Blot Cambridge Biotech e/ou reagentes individuais de 2-8 °C.
- As tiras de Nitrocelulose não usadas devem continuar secas e no escuro, no seu tubo de estocagem, entre 2 e 8 °C.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO E PLASMA

- O Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit deve ser usado com soro ou plasma humano. A confiabilidade dos resultados com amostras muito lipêmicas, hemolisadas ou turvas não é conhecida.
- As amostras devem ser guardadas de 2 a 8 °C por até 2 semanas. Para intervalos maiores elas devem ser congeladas (-18°C ou menos) antes do teste.
- Evite ciclos repetitivos de congelamento/descongelamento.
- Misture bem as amostras. Centrifugue, se necessário para remover partículas antes do uso.
- Se as amostras forem embarcadas, estas devem ser embarcadas de acordo com os requerimentos para transporte de agentes etiológicos.

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

Mudanças na aparência dos reagentes fornecidos podem indicar instabilidade ou deterioração desses materiais. O SUBSTRATO A não deve ter cor. **Se o SUBSTRATO A mostrar cor, terá sofrido oxidação e não deve ser usado.**

SUBSTÂNCIAS QUE INTERFEREM NO TESTE

A azida sódica interfere na atividade da peroxidase.

MATERIAIS FORNECIDOS

Cada cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit contém:

TIRAS DE NITROCELULOSE	27 TIRAS
CONTROLE NÃO REAGENTE	1 FRASCO (verde) (mínimo 160 µL/frasco)
CONTROLE FRACAMENTE REAGENTE	1 FRASCO (lavanda) (mínimo 160 µL/frasco)
CONTROLE FORTEMENTE REAGENTE	1 FRASCO (vermelho) (mínimo 160 µL/frasco)
TAMPÃO DE LAVAGEM (20x)	1 FRASCO (mínimo 60mL/frasco)
TAMPÃO BLOTTING (10x)	1 FRASCO (mínimo 18 mL/frasco)
CONJUGADO 1	1 FRASCO (azul) (mínimo 160 µL/frasco)
CONJUGADO 2	1 FRASCO (preto) (mínimo 160 µL/frasco)
SUBSTRATO A	1 FRASCO (mínimo 30 mL/frasco)
SUBSTRATO B	1 FRASCO (mínimo 30 mL/frasco)
PÓ DE BLOTTING	1 PACOTE (mínimo 9.0 g)
BANDEJAS INCUBADORAS	3 BANDEJAS (9 cavidades/bandeja)

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Agitador ou plataforma rotatória
- Pipetas
- Pipetadores e ponteiros
- Aspirador com descarte com desinfetante
- Piças

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

NOTA: Para teste em soro ou plasma, o Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit permite a realização do teste em dois procedimentos de ensaio diferentes: overnight ou em um dia.

CUIDADO: Quando manusear a bandeja incubadora fornecida no kit, tome cuidado para não respingar ou misturar as amostras. Remova a tampa cuidadosamente para prevenir condensação. Não manipule amostras ou ponteiros de pipetas com amostras sobre as bandejas incubadoras descobertas. Respingos ou aerossóis podem causar contaminação cruzada das cavidades das amostras.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO OVERNIGHT

- Deixe que os reagentes atinjam a temperatura ambiente antes do uso. (aproximadamente 30 minutos)
 - Adicione 2.0 mL de TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO em cada cavidade a ser usada.
 - Usando uma pinça, cuidadosamente a TIRA DE NITROCELULOSE do frasco e coloque com o lado numerado para cima em cada cavidade contendo Tampão de lavagem diluído.
 - Coloque a bandeja no agitador ou na plataforma rotatória por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente, então remova o tampão por aspiração.
 - Adicione 2 mL de TAMPÃO DE TRABALHO DO BLOTTING em cada cavidade.
 - Adicione 20 µL de cada amostra não diluída ou controle em cada cavidade contendo sua tira específica em Tampão de trabalho do blotting. **CUIDADO:** Use uma ponteira diferente para cada amostra.
 - Tampe a bandeja e incube no agitador ou plataforma rotatória durante a noite (14-20 horas) à temperatura ambiente (20-28 °C).
 - Cuidadosamente destampe a bandeja para evitar respingos ou mistura das amostras. Remova a condensação ou gotículas na tampa da bandeja de incubação lavando com o Tampão de lavagem diluído ou enxugando com toalhas absorventes.
 - Aspire a mistura das cavidades num recipiente contendo desinfetante. Lave a ponta do aspirador com Tampão de lavagem diluído ou água deionizada entre as amostras para evitar contaminação.
 - Em cada tira, adicione 2.0 mL de TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO e agite manualmente várias vezes. Remova o tampão por aspiração.
 - Adicione 2.0 mL de TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO em cada tira por no mínimo 5 minutos. Repita a operação aspirando o tampão de lavagem antes e entre cada uma das lavagens de 5 minutos. Realize todos os passos de lavagem à temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória.
 - Adicione 2.0 mL de SOLUÇÃO 1 DE TRABALHO DE CONJUGADO (preparado de acordo com o teste Overnight na folha de Instruções suplementares) em cada cavidade. Incube por 60 minutos à temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória.
 - Aspire o conjugado das cavidades. Lave cada tira três vezes por 5 minutos como descrito no passo 11.
 - Adicione 2.0 mL de Solução de trabalho 2 do conjugado (preparado de acordo com o teste Overnight na folha de Instruções suplementares) em cada cavidade. Incube por 60 minutos em temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória.
 - Aspire os conjugados das cavidades. Lave cada tira três vezes por 5 minutos como descrito no passo 11.
 - Adicione 2.0 mL de SOLUÇÃO DE TRABALHO DO SUBSTRATO em cada cavidade. Incube à temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória, por 10 a 15 minutos (ou até que o controle positivo fraco mostre as bandas p24 e gp160)
 - Aspire o substrato e pare a reação enxugando as tiras duas ou três vezes com no mínimo 2 mL de água grau reagente.
- ATENÇÃO:** Algumas amostras poderão causar manchas nas tiras devido a precipitação. Uma mecha de algodão embebida em água grau reagente poderá ser usada para remoção cuidadosa das manchas para permitir melhor visualização dos resultados.
- Deixe as tiras secarem ao ar livre entre toalhas de papel absorvente e marcá-las como descrito na seção Interpretação dos Resultados. Para melhores resultados e consistência, as tiras devem ser marcadas logo após secagem. As tiras podem então ser montadas e armazenadas entre folhas plásticas limpas. Durante a montagem com fita adesiva não cubra as faixas pois isso determinará o desaparecimento das bandas.
- Se desejar, as fitas podem ser fotografadas usando um filme de alta resolução. As tiras manterão sua coloração se armazenadas no escuro. A exposição à luz e ao ar podem eventualmente causar o desaparecimento das bandas.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE UM DIA

- Deixe que os reagentes atinjam a temperatura ambiente antes do uso. (aproximadamente 30 minutos)
- Adicione 2.0 mL de TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO em cada cavidade a ser usada.
- Usando uma pinça, cuidadosamente remova a TIRA DE NITROCELULOSE do frasco e coloque com o lado numerado para cima em cada cavidade contendo Tampão de lavagem diluído.
- Coloque a bandeja no agitador ou na plataforma rotatória por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente, então remova o tampão por aspiração.
- Adicione 2 mL de TAMPÃO DE TRABALHO DO BLOTTING em cada cavidade.
- Adicione 30 µL de cada amostra não diluída ou controle em cada cavidade contendo sua tira específica em Tampão de Trabalho do Blotting. **CUIDADO:** Use uma ponteira diferente para cada amostra.
- Tampe a bandeja e incube no agitador ou plataforma rotatória por duas (2) horas a temperatura ambiente (20 a 28° C).

- Cuidadosamente destampe a bandeja para evitar respingos ou mistura das amostras. Remova a condensação ou gotículas na tampa da bandeja de incubação lavando com o Tampão de lavagem diluído ou enxugando com toalhas absorventes.
- Aspire a mistura das cavidades num recipiente contendo desinfetante. Lave a ponta do aspirador com TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO ou água deionizada entre as amostras para evitar contaminação cruzada.
- Em cada tira, adicione 2.0 mL de TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO e agite manualmente várias vezes. Remova o tampão por aspiração.
- Adicione 2.0 mL de TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO em cada tira por no mínimo 5 minutos. Aspire o tampão de lavagem entre as lavagens. Repita a operação, aspirando o tampão de lavagem antes e entre cada uma das lavagens de 5 minutos. Realize todos os passos de lavagem à temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória.
- Adicione 2.0 mL de SOLUÇÃO DE TRABALHO DE CONJUGADO 1 (preparado de acordo com o ensaio de um dia na folha de Instruções Suplementares) em cada cavidade. Incube por 60 minutos à temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória.
- Aspire o conjugado das cavidades. Lave cada tira três vezes por 5 minutos como no passo 11 acima.
- Adicione 2.0 mL de Solução de trabalho do conjugado 2 (preparado de acordo com o ensaio de um dia na folha de Instruções suplementares) em cada cavidade. Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória.
- Aspire os conjugados das cavidades. Lave cada tira três vezes por 5 minutos como no passo 11 acima.
- Adicione 2.0 mL de SOLUÇÃO DE TRABALHO DO SUBSTRATO em cada cavidade. Incube a temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória por 10 a 15 minutos (ou até que o controle positivo fraco mostre as bandas p24 e gp160).
- Aspire o substrato e pare a reação enxugando as tiras 2 ou 3 vezes com pelo menos 2 mL de água grau reagente.

ATENÇÃO : Algumas amostras poderão causar manchas nas tiras devido a precipitação. Uma mecha de algodão embebida em água grau reagente poderá ser usada para remoção cuidadosa das manchas para permitir melhor visualização dos resultados.

Deixe as tiras secarem ao ar livre entre toalhas de papel absorvente e marcá-las como descrito na seção Interpretação dos Resultados. Para melhores resultados e consistência, as tiras devem ser marcadas logo após secagem. As tiras podem então ser montadas e armazenadas entre folhas plásticas limpas. Durante a montagem com fita adesiva não cubra as faixas pois isso determinará o desaparecimento das bandas.

- Se desejar, as fitas podem ser fotografadas usando um filme de alta resolução. As tiras manterão sua coloração se armazenadas no escuro. A exposição à luz e ao ar podem eventualmente causar o desaparecimento das bandas.

CONTROLE DE QUALIDADE

Os controles "não reagente" e "fracamente reagente" devem ser incluídos em cada ensaio, independentemente do número de amostras testadas ou fitas de nitrocelulose utilizadas. O controle "fortemente reagente" é utilizado para estabelecer critérios de reatividade das bandas e deve ser incluído no primeiro ensaio das amostras para cada kit. O controle "fortemente reagente" não precisa ser incluído nos outros ensaios a menos que a tira do primeiro ensaio esteja manchada ou desbotada.

Para que os resultados obtidos em cada um dos ensaios sejam válidos, as seguintes condições devem ser respeitadas :

- Controle "não reagente": nenhuma banda deve ser visível na fita de nitrocelulose usado para testar o controle não reagente.
- Controle "fortemente reagente": todas as bandas de peso molecular relevante devem ser visíveis na fita de nitrocelulose usada para testar o controle "fortemente reagente". Estas bandas são p17, p24, p31, gp41, p55, p66 e gp160. A banda gp 120 também pode ser visualizada mas não é um critério absoluto de aceitação . A figura 1, constitui um guia do posicionamento relativo das bandas visualizadas a partir do Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit e permite identificar as bandas observadas no controle "fortemente reagente".
- Controle "fracamente reagente": a fita de nitrocelulose usada para testar o controle "fracamente reagente" mede a sensibilidade do Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit e deve exibir as bandas p24 e gp 160. Bandas adicionais podem aparecer mas não necessariamente demonstram um bom rendimento. A figura 1 permite a identificação das bandas observadas pelo controle "fracamente reagente".

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

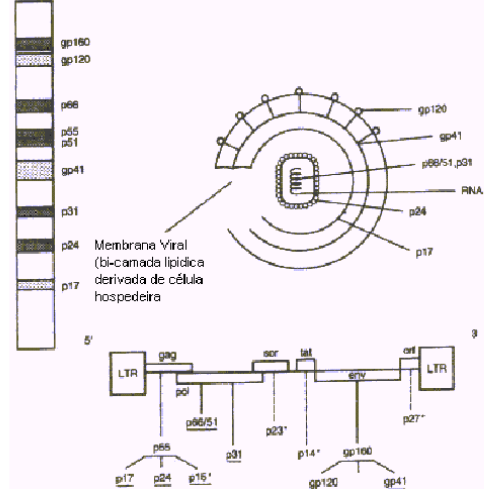
A presença ou ausência de anticorpos de HIV-1 na amostra e a identificação de quaisquer anticorpos presentes são determinadas por comparação de cada fita de nitrocelulose com as fitas usadas com o "controle não reagente" e o "controle fracamente reagente" presentes e testados com aquele ensaio e a tira usada para o controle "fortemente reagente" testado uma vez com o kit. O processo de interpretação requer três etapas. Em primeiro lugar , cada banda que aparece na fita do teste deve ser identificada baseada na fita do "controle fortemente reativo". Em segundo lugar , cada banda é associada a uma reatividade baseada na sua intensidade . Em terceiro lugar , a fita é interpretada baseada na combinação das bandas padrões e da reatividade .

A figura 1 é usada para localizar e identificar as bandas na fita usada com o "controle fortemente reagente" . A fita é então usada para identificar as bandas presentes nas fitas

usadas para testar amostras específicas .

FIGURA 1

Bandas específicas de vírus para controles fortemente reagentes



* Estas proteínas do HIV-1 geralmente não aparecem com o Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot.

Os principais produtos de genes de HIV-1 que foram identificados⁵⁻¹⁰ são, como seguem (ver figura 1)

gp160	Precursor da glicoproteína ENV
gp120	Glicoproteína externa ENV
p66	Componente da transcriptase reversa da tradução POL
p55	Precursor das proteínas GAG
p51	Componente da transcriptase reversa da tradução POL
gp41	Glicoproteína transmembrana ENV
p31	Componente da endonuclease da tradução POL
p24	Proteína GAG
p17	Proteína GAG

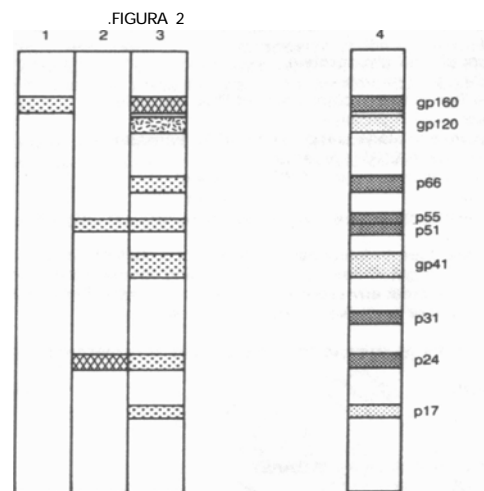
NOTA: a banda gp160 pode , em muitos casos, representar um múltiplo de gp41¹¹ . Entretanto a presença de gp120 foi verificada usando anticorpos mono e policlonais.

A primeira resposta de muitos anticorpos reativos ENV pelo Western Blot aparece na parte da transmembrana onde se apresenta como um tetrâmero ou derivado de um precursor .

A intensidade das bandas presentes nas fitas usadas para testar as amostras específicas deram os seguintes resultados .

Intensidade da banda	Resultado da reatividade
Ausente	-
Menos intenso que o p24 na fita de controle "fracamente reagente"	±
Pelo menos tão intenso quanto o p24 na fita de controle fracamente reagente, mas menos intenso que o p24 na fita de controle reativo forte	+
Com intensidade maior ou igual ao p24 na fita de controle fortemente reagente	++

Veja os exemplos específicos na figura 2



CONTROLE FORTEMENTE REAGENTE

Tira	Interpretação	Bandas presentes
1	Indeterminado	gp160
2	Indeterminado	p24, p55
3	Positivo	p17, p24, gp41, p55, p66, gp120, gp160
4	Controle Fortemente Reagente	p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120, gp160

Usar o CONTROLE FORTEMENTE REAGENTE como referência para a posição das bandas, a banda p24 do controle "fracamente reagente" como referência para intensidade das bandas, cada banda da tira deverá receber um nível de reatividade. Na análise das amostras testadas é de grande ajuda colocar as tiras de controle lado a lado com as tiras das amostras testadas para facilitar a identificação dos pesos moleculares e a intensidade de cada banda. Os resultados do blotting é então interpretado como NEGATIVO, INDETERMINADO ou POSITIVO baseado no padrão que estiver presente, de acordo com a seguinte tabela:

Padrão	Interpretação
- Nenhuma banda presente	Negativo
- Qualquer banda presente porém, sem apresentar padrão para critérios positivos	Indeterminado
- Presença de quaisquer 2 ou mais das seguintes bandas: p24, gp41 e gp 120/160. Cada banda tem uma reatividade + ou maior. Comumente, a banda gp41 ou gp160 é difusa. Outras bandas virais podem ou não estar presentes.	Positivo

O critério de positividade segue as recomendações do Center of Disease Control (CDC)¹² e Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors (ASTPHLD)¹³. Essas publicações, assim como outras^{14,15} tem sugerido que o aparecimento adicional da banda p31 não é necessário.

Estudos clínicos com o Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit tem indicado que é inapropriado atribuir uma interpretação positiva para tiras que mostrem bandas mas não apresentem quaisquer das duas bandas p24, gp41 e/ou gp120/160, com um resultado de reatividade de + ou maior para cada banda presente. Sabe-se que pessoas com soroconversão recente podem mostrar padrões incompletos, mas que estes desenvolverão aumento de reatividade (número e intensidade das bandas), quando acompanhados por um período de 4 a 6 meses. A maioria das tiras com resultados positivos apresentarão outras bandas incluindo o p17, p31, p51, p55, p66, e gp120.

Por outro lado, pessoas de baixo risco de infecção poderão apresentar reações não específicas no blot, particularmente nas regiões correspondentes a p17, p24, p55, e p66, as quais poderão persistir mas que não evoluem para padrões mais completos ao longo do tempo. Apesar da reatividade não específica às vezes poder ser atribuída à presença de anticorpos, é possível que em alguns casos o padrão pode apresentar uma reação cruzada com um outro retrovírus humano. Pessoas com infecção por HIV podem também apresentar os padrões incompletos devido ao histórico natural de AIDS ou outros estados de imunodeficiência. Em particular, tem sido notado que pacientes com AIDS perdem a reatividade aos anticorpos para p24 e p31, e que bebês e crianças pequenas infectados podem falhar na soroconversão. Além disso, testes em bebês podem ser positivos para HIV devido a transferência passiva de anticorpos maternos que podem persistir durante alguns meses. Pacientes com doenças malignas e pacientes que recebem drogas imunossupressoras podem também não desenvolver um padrão positivo.

Uma vez que a reatividade de qualquer grau com quaisquer proteínas específicas (i.e., p24, p31, p66/51, ou gp41/120/160) identificadas na tira seja evidência presumível de anticorpos para HIV, qualquer resultado (interpretado como indeterminado) é tido como suspeito e NECESSITA REPETIÇÃO E ACOMPANHAMENTO. OS RESULTADOS INDETERMINADOS NÃO PODEM SER CONSIDERADOS POSITIVOS OU NEGATIVOS. (Veja na seção LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO). A correta avaliação nestas situações deve estar baseada nos exames subsequentes e avaliação clínica. Nestes casos, manchas indeterminadas podem oferecer informações úteis.

A visualização de duas amostras indeterminadas e uma positiva são vistas na figura 2.

Em alguns casos bandas não virais podem ser observadas em certas amostras. Essas bandas geralmente não são acompanhadas de qualquer banda viral de diagnóstico significante (p24, gp41/120/160). As bandas não virais aparecem em certos casos relatados e as mais comuns são de peso molecular de 70k ; 51-55 k (possibilidade de HLA-DR) e 43k (possibilidade de HLA-ABC).

NOTA: Presume-se que uma pessoa que tem anticorpo anti-HIV-1 está infectada com o vírus, exceto uma pessoa que tenha participado de um estudo de vacina para HIV, pois pode ter desenvolvido anticorpo contra a vacina e pode estar ou não infectada pelo HIV. São indicadas a correlação clínica com aconselhamento apropriado, avaliação médica e possíveis testes adicionais para decidir a precisão de um diagnóstico de infecção por HIV.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A boa performance do teste requer seguir estritamente as instruções do procedimento mostradas nesta bula. Variações destas instruções podem levar a resultados anormais. Amostras com alta reatividade podem causar uma revelação excessiva das tiras provocando uma difícil interpretação devido a forte cor de fundo desenvolvida. Estas amostras devem ser diluídas a 1:50 em tampão de trabalho e as amostras diluídas devem ser testadas com o procedimento padrão descrito acima.

Algumas leves ambigüidades existem na definição do peso molecular de antígenos HIV-1. As definições listadas na figura 1 foram estabelecidas tanto por testes internos com marcas conhecidas como consensos de literaturas publicadas⁶⁻¹⁰.

Apesar de um blot Positivo para anticorpos para HIV-1 indicar infecção com o vírus, um diagnóstico de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou AIDS pode somente ser dado clinicamente se uma pessoa se encontrar nos casos definidos de AIDS estabelecidos pelo Centro para Controle de Doenças. Pessoas com blots Positivos para anticorpos de HIV-1

devem ser encaminhadas para avaliação médica que podem incluir testes adicionais. As implicações clínicas de anticorpos de HIV-1 em uma pessoa assintomática não são conhecidas. Entretanto, uma larga proporção de pessoas tem vírus detectáveis em seu sangue e algumas vão desenvolver a imunodeficiência¹⁰.

Blots indeterminados não devem ser usados como base para diagnóstico de infecção por HIV-1. Entretanto, eles podem fornecer informações necessárias no contexto de uma avaliação médica quando informações clínicas estão disponíveis.

DEVIDO A VARIACÃO NAS REALIZAÇÕES DOS TESTES E A INCERTEZA ASSOCIADA COM BLOTS INDETERMINADOS*, É RECOMENDADO QUE TODO BLOT INDETERMINADO SEJA REPETIDO USANDO A AMOSTRA ORIGINAL. DOADORES DE SANGUE COM UM BLOT INDETERMINADO DEVEM SER RETESTADOS USANDO UMA AMOSTRA FRESCA APÓS SEIS MESES.

UM BLOT NEGATIVO NÃO EXCLUI A POSSIBILIDADE DE UMA INFECÇÃO COM HIV-1.

#Contendo reatividade para proteínas específicas do vírus p24, p31, p66/51 ou gp41/160

VALORES ESPERADOS DE SORO E PLASMA

O desempenho do Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit foi avaliado nos laboratórios clínicos em população de alto risco, baixo risco e aidéticos. A tabela A resume a distribuição das faixas específicas destes grupos.

TABELA A
Frequência de bandas específicas do vírus no Western Blot, em grupos clínicos

GRUPO CLÍNICO	NÚMERO ESTUDADO	Nº COM BANDAS	PORCENTAGEM DE WESTERN BLOT COM PRESENÇA DAS BANDAS INDICADAS							
			p17	p24	p31	gp41	p51	p55	p66	gp120/160
Baixo Risco*	364	168	54	70	70	75	64	71	75	79
Alto Risco*	149	56	71	86	95	96	91	84	98	96
AIDS	52	52	21	60	83	100	67	42	77	98

*Inclui amostras Elisa negativo e Elisa positivo repetidas vezes.

A tabela B resume a distribuição dos resultados, quando grupos clínicos são apresentados de acordo com o procedimento descrito na seção Interpretação dos Resultados, desta bula.

TABELA B
Interpretação do Western Blot definido dentro de cada grupo clínico **.

GRUPO CLÍNICO	RESULTADO ELISA	NÚMERO ESTUDADO	NÚMERO (%) NEGATIVOS	NÚMERO (%) INDETERMINADOS	NÚMERO (%) POSITIVOS
Baixo Risco	Negativo #	86	73 (85)	13 (15)	0 (0)
	Positivo*	278	123 (44)	29 (11)	126 (45)
Alto Risco	Negativo #	92	90 (98)	2 (2)	0 (0)
	Positivo *	57	3 (5)	1 (2)	53 (98)
AIDS	Desconhecido	52	0 (0)	0 (0)	52 (100)

** Utilizando critérios definidos na seção Interpretação dos Resultados

Negativo em 5 testes ELISA licenciados

* Repetidamente reativo para 1 ou mais dos 5 testes de Elisa licenciados.

Testes adicionais aos testes realizados com o Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit foram realizados em amostras de pessoas com outras condições clínicas que podem causar reações com proteínas presentes. Foram incluídas amostras de pessoas com: doenças autoimunes, anticorpos anti-HLA, gamopatias policlonais e outras infecções virais que não o HIV-1. A tabela C resume estes dados. Não houveram amostras neste grupo que pudessem ser interpretadas como positivas no blot.

TABELA C
RESUMO DE RESULTADOS DE WESTERN BLOT EM OUTRAS CONDIÇÕES CLÍNICAS

	Nº estudado	Nº com bandas	p17	P24	p31	gp41	P51	p55	p66	gp20 /160	Outras (a)
Outras doenças virais (b)	124	11	0	9	0	0	0	2	0	0	1
Doenças infecciosas (c)	5	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Bilirrubina elevada	24	15	0	2	0	0	0	11	1	0	10
Lupus sistêmico	19	6	0	1	0	0	0	5	0	0	0
Hemólise eritomatosa (in vitro)	22	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0
Fator reumatóide	26	13	0	1	0	0	0	7	0	0	7
Gamopatia policlonal	17	8	0	1	0	1	1	6	2	2	5
Anticorpos HLA	39	27	0	2	1	0	1	20	2	0	21

(a) Outras bandas estão restritas às regiões p45-50 ou p70-80.

(b) Outras doenças virais incluem : 2 vírus Epstein-barr, 1 vírus Varicela-zoster, 3 citomegalovírus, 3 vírus Herpes simples, 1 vírus sarampo, 1 vírus de caxumba, 2 coxsackie, 2 adenovírus, 2 influenza A e 107 amostras provenientes da África, Jamaica, Trinidad, Havaí e da maior parte dos EUA, as quais resultaram fortemente reativas para HTLV-I, uma leve forte reatividade na região do p24 e alguma atividade na região do p55 quando testadas com o Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit. Além disso, 7 dessas amostras tiveram uma banda fraca no p24.

(c) Outras doenças infecciosas incluem: 2 toxoplasmose, 3 *M. pneumoniae*.

PRECISÃO DO SORO E PLASMA

A precisão do Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit foi avaliado num estudo de campo realizado em 4 centros de cooperação, nos quais os pesquisadores testaram

um painel de soro em replicata em dias diferentes usando lotes diferentes. Em cada centro, cada blot foi interpretado separadamente por , pelo menos dois leitores. Ver tabela D.

TABELA D
RESULTADOS DE REATIVIDADE ESPERADA E PORCENTAGEM DE REPLICATA DE WESTERN
BLOTS COM BANDAS REAGENTES
SCORE DE REATIVIDADE ESPERADA

(% de replicatas reagentes em amostras teste)

	p17	p24	p31	gp41	p51	p55	p66	gp120/ 160
Controle fracamente positivo	± (16.1)	+ (100.0)	- (0.0)	± (71.0)	± (61.3)	± (93.5)	± (98.4)	+ (100.0)
Amostra 1	± (81.3)	± (31.3)	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	± (50.0)	+ (100.0)	+ (100.0)
Amostra 2	- (0.0)	+ (100.0)	- (0.0)	+ (100.0)	- (3.0)	+ (100.0)	± (29.7)	+ (100.0)
Amostra 3	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	- (0.0)	± (90.7)	+ (100.0)	+ (100.0)
Controle fortemente positivo	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)	+ (100.0)
Controle negativo	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)

Os resultados destas análises foram interpretados para mostrar que bandas mais reagentes que o CONTROLE FRACAMENTE POSITIVO foram altamente reprodutíveis, mas bandas mais fracas que o CONTROLE FRACAMENTE POSITIVO não foram tão reprodutíveis.

BIBLIOGRAFIA

1. Tsang, V.C.W, J.M. Peralta, e A.R. Simons, 1983. Enzymelinked Immunoelctrotransfer Blot Techinques (EITB) for Studying the Specificities of Antigens and Antibodies Separated by Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology* 92:377-391.
2. Sargngadharan, M.G., M. Popovic, L. Bruch, L. Shubbach, e R.C.Gallo, 1984. Antibodies Reactive With Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224:506-508.
3. Popovic, M., M.G Sargngadharan, E. Read, e R.Gallo, 1984. Detection, Isolation and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patientes with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224:497-500
4. Centers for Disease Control, 1982. Usdate on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *United States Morbidity and Mortality Weekley Report*, 31:507:508.
5. Steiner, K.S., K.W. Higgins, M.A. Powers, et al. 1986. Recombinant Polypeptide from the Endonucleases Region of the Acquired Immune Deficiency Syndrome Retrovirus Polymerase(pol) Gene Detects Serum Antibodies in Most Infected Individuals. *Journal of Virology*, 58:9-16.
6. Veroneze, F., A Devico, T. Copeland, A DeVico, et al. 1986. Characterization of Highly Immunogenic p66/p51 as the Reserve Transcriptase of HIV/LAV. *Science* 231-1289-1291.
7. Veronese, F., T. Copeland, S. Oroszland, R.C Gallo, MG. Sargngadharan, 1985. Characterization of gp41 as the Transmembrane Protein coded by the HIV/LAV Envelope Gene. *Science* 229:1402-1405.
8. Allan, J.S., J.E. Coligan, F. Barin, et al. 1985. Major Glycoprotein Antigens that Induce Antibodies in AIDS Patients are Encoded by HIV. *Science* 228:291-294.
9. Sargngadharan, M.G., F. veronese, S.Lee, R.C. Gallo, 1985. Immunological Properties of HTLV-III Infection. *Cancer Research*, 45:4572s-4577s.
10. Groopman, J.E., F.W. Chen, J. A. Hope, et al. 1986. Serological Characterization of HIV Infection in AIDS and Related Disorders. *The Journal of Infectious Diseases*, 153:736-742.
11. Pinter A., W.J.Honne, S.A Tilley, et al., 1989. Oligomeric structure of gp 41, the transmembrane protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virology* 63:2674-9.
12. Centers for Disease Control, 1989. Interpretation and use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. *MMWR* 38 (No. S-7):1-7.
13. Hausler, W.J., 1988. Report of the Third Consensus Conference of HIV Testing sponsored by the Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 9:345-349.
14. Leitman, S.F., H.G. Klein, J.J. Melpolder, et al., 1989. Clinical Implications of Positive Tests for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Asymptomatic Blood Donors. *N Eng J Med* 318:917-924.
15. Berenson, S., K.M. Peddecord, L.K. Hofherr, M.S. Ascher, R.N. Taylor and T.L. Hearn, 1990. Reporting the Results of Human Immunodeficiency Virus Testing. *JAMA* 262 No. 24:3435-3438.

16. O'Gorman, M.R.G., D. Weber, S.E. Landis, et al., 1991. Interpretive Criteria of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of human immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Arch Pathol Lab Med* 115:26-30.

Fabricado por: Maxim Biomedical, Inc.
Rockville, Maryland 20850-5307

Distribuído por: REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282 – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900
CNPJ: 47.334.701/0001-20

Serviço de Atendimento ao Consumidor:
REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282 – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900

Data de revisão : 01 de Junho de 2009 (LN20583.06)

Rev.: 04/10

Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot Kit

Introdução

Anticorpos de cabra anti IgG humana purificados conjugados por afinidade com Biotina (conjugado 1) e Avidina conjugada à peroxidase de rábano (conjugado 2) deve ser diluída antes do uso no Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot Kit. As diluições ideais para o uso de cada lote de Conjugado fornecido com este kit e as instruções para preparo das soluções de trabalho dos conjugados estão contidas nestas instruções.

Nota: A diluição do Conjugado é específica para o formato do ensaio que esta sendo realizado (Ensaio de um dia ou Overnight). Tenha certeza do uso da diluição apropriada para o formato do ensaio a ser realizado.

Usar somente com o kit Master de lote número : **

Ensaio Overnight – Diluição do Conjugado

Conjugado 1 lot n°. ** Diluição de Trabalho 1: **
Conjugado 2 lot n°. ** Diluição de Trabalho 1: **

Ensaio um dia – Diluição do Conjugado

Conjugado 1 lot n°. ** Diluição de Trabalho 1: **
Conjugado 2 lot n°. ** Diluição de Trabalho 1: **

**** IMPORTANTE: Verificar as informações de número de lote e valores de diluição de trabalho nas Instruções Suplementares em inglês, pois estas informações variam lote a lote.**

Procedimento:

Nota: Refere-se a instruções complementares do produto para o uso do kit HIV-1 Western Blot Cambridge Biotech.

Serão necessários 2 mL da Solução de Trabalho do Conjugado para cada tira a ser testada.

- 1- Deixar o conjugado alcançar a temperatura ambiente antes do uso (aproximadamente 30 min).
- 2- A Solução de Trabalho do Conjugado deverá ser preparada recentemente com o Tampão de Trabalho do Blotting.
- 3- Para determinar o volume em -L do Tampão de Trabalho do Blotting para ser diluído, multiplicar o número de tiras a ser testadas por 2000 -L.
- 4-
 - a) Para determinar o volume a ser diluído em -L , do Conjugado 1, dividir o volume do Tampão de Trabalho do Blotting calculado no passo 3 pelo número apropriado mostrado na tabela acima.
 - b) Para preparar Solução de Trabalho do Conjugado 1, adicionar o volume do Conjugado 1 do passo 4a para o volume do Tampão de Trabalho do Blotting do passo 3. Homogeneizar gentilmente por inversão. Retorne o Conjugado 1 para 2 a 8°C após o uso.
- 5-
 - a) Para determinar o volume a ser diluído em -L , do Conjugado 2, dividir o volume do Tampão de Trabalho do Blotting calculado no passo 3 pelo número apropriado mostrado na tabela acima.
 - b) Para preparar Solução de Trabalho do Conjugado 2, adicionar o volume do Conjugado 2 do passo 5a para o volume do Tampão de Trabalho do Blotting do passo 3. Homogeneizar gentilmente por inversão. Retorne o Conjugado 2 para 2 a 8°C após o uso.

Rev.: LN 20437.04