



HTLV I+II

ELISA recombinate v.4.0

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos contra los virus HTLV I y II

SIGNIFICACION CLINICA

Los virus linfotrópicos de células T humanas tipo HTLV pertenecen a la familia de los retrovirus, se dividen en dos tipos: HTLV-I y HTLV-II. Están asociados a enfermedades malignas de las células T y a procesos neurológicos degenerativos. El HTLV-I es el causante etiológico de dos tipos de patologías: la leucemia de células T de adulto (ATL) y diversos trastornos neurológicos de desmielinización que incluyen la mielopatía asociada a HTLV-I (HAM) y la paraparesia espástica tropical (TSP). También se detectan anticuerpos específicos contra HTLV-I en ciertos casos de dermatitis, uveítis, poliomiositis y artritis.

El HTLV-II ha sido asociado a síndromes neurológicos similares a la HAM.

Ambos virus se transmiten por contacto sexual, exposición a sangre contaminada, transfusión, o transmisión de una madre infectada al feto durante el período prenatal o a través de la leche materna.

El ensayo **HTLV I+II ELISA recombinate v.4.0.** está diseñado para detectar anticuerpos tanto contra HTLV-I como contra HTLV-II. Se puede emplear en el diagnóstico de la infección y en el control de unidades de donantes en bancos de sangre.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Los pocillos de la policubeta están recubiertos con antígenos recombinantes de los virus HTLV I y II. La muestra diluida se incuba en los pocillos. Si los anticuerpos contra uno de los virus están presentes en la muestra, éstos se unen a los antígenos del pocillo. El material no unido es removido por lavado. En el paso siguiente se agrega el conjugado, que consiste en antígenos de HTLV I y HTLV II conjugados con peroxidasa. Este se une a los complejos antígeno-anticuerpo, formados previamente. El conjugado no unido se remueve por lavado. Posteriormente, se agrega una solución conteniendo tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno. Las muestras reactivas desarrollan color celeste que vira al amarillo cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico (Stopper).

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removibles con 96 pocillos recubiertos con antígenos recombinantes de los virus HTLV I y II.

Diluyente de Muestra: buffer salino con tensioactivo. Color violeta.

Conjugado: antígenos de HTLV I y HTLV II conjugados con peroxidasa. Color rojo.

TMB: solución de tetrametilbencidina 36 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) 100%, (100x).

Diluyente de TMB: buffer citrato 40 mM y peróxido de hidrógeno 1,27 mM, pH 4,3.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado Concentrado: buffer salino con tensioactivo (25x). Color verde.

Control Positivo: suero humano inactivado conteniendo anticuerpos contra HTLV I y/o HTLV II. Color naranja.

Control Negativo: suero humano no reactivo inactivado. Color amarillo.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada o desionizada.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas para medir los volúmenes indicados
- Tips descartables
- Material volumétrico para preparar las diluciones indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorbente
- Guantes descartables
- Reloj alarma o cronómetro
- Hipoclorito de sodio
- Sistema de lavado de policubetas (manual o automático)
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas

PRECAUCIONES

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Los controles se encuentran inactivados. Sin embargo deben emplearse como si se tratara de material infectivo.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), y anticuerpos contra el virus de Hepatitis C (HCV), encontrándose no reactivos. Debido al alto nivel de infección simultánea por HIV, ciertos controles reactivos para HTLV I + II pueden resultar también reactivos para HIV. Se recomienda manipularlos con las precauciones requeridas para muestras potencialmente infecciosas.
- A fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos, los materiales empleados en el ensayo deben descontaminarse antes de ser descartados. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante un mínimo de 60 minutos.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos u otras fuentes

entren en contacto con los reactivos, ya que el hipoclorito afecta la reacción.

- Evitar el derrame de líquidos y formación de aerosoles.
- No usar los reactivos luego de la fecha de vencimiento.
- No intercambiar reactivos de distintos kits o lotes, o modificar los procedimientos del ensayo.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Evitar tocar las paredes de los pocillos con los tips.
- No utilizar elementos metálicos que puedan entrar en contacto con los reactivos.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso. No usar baño de agua para la incubación.
- El ácido sulfúrico (Stopper) es corrosivo. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
- No pipetear con la boca. Usar guantes descartables y protección en los ojos durante la manipulación de las muestras y reactivos del ensayo.
- La TMB es sensible a la luz. Mantenga el frasco cerrado cuando no se utiliza.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa vigente.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Es importante que todo el material utilizado para la preparación de los reactivos esté limpio y libre de detergente e hipoclorito.

Buffer de Lavado: a baja temperatura los componentes del reactivo concentrado pueden precipitar. En tal caso, llevar la solución a 37°C hasta disolución completa. Para la obtención del buffer de lavado listo para usar (1x), diluir una parte de Buffer de Lavado Concentrado (25x) con 24 partes de agua destilada o desionizada. Ej.: 20 ml con 480 ml para una policubeta.

Revelador: en un tubo rotulado, diluir la TMB concentrada (100x) en el Diluyente de TMB. Ej.: 200 ul en 20 ml para una policubeta. La TMB concentrada está disuelta en DMSO. Dado que la temperatura de fusión del DMSO es 18°C, la TMB debe alcanzar temperatura ambiente (20-25°C) y homogeneizarse bien antes de usar.

Policubeta sensibilizada, Diluyente de Muestra, Conjugado, Stopper, Control Positivo y Control Negativo: listos para usar.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado Concentrado y Stopper: conservar a temperatura entre 2 y 25°C.

Buffer de lavado (1x): conservar en recipiente cerrado. Es estable 3 meses a temperatura entre 2 y 25°C.

Policubeta sensibilizada: abrir el sobre cuando haya tomado temperatura ambiente y no antes del momento de usar, de lo contrario se favorecerá la condensación de humedad sobre la superficie de los pocillos. Las tiras no utilizadas se deben conservar a 2-10°C dentro del sobre con desecante y cerrado. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 4 meses posteriores, mientras no se supere la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Revelador: una vez preparado se debe usar dentro de las 3 horas conservándolo a temperatura ambiente (2-25°C) y protegiendo de la luz. En caso de coloración, debe ser descartado.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección de muestra: obtener de la manera habitual.

b) Aditivos: no se requieren para suero. Para las muestras de plasma se puede emplear heparina, citrato, fluoruro o EDTA como anticoagulantes.

c) Sustancias Interferentes conocidas: no se observa interferencia por bilirrubina hasta 30 mg/dl, ácido ascórbico hasta 50 mg/dl, triglicéridos hasta 750 mg/dl o hemoglobina hasta 300 mg/dl. Muestras conteniendo partículas deberán clarificarse mediante centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra puede conservarse refrigerada (2-10°C) hasta 3 días. Si se necesita conservarla por más tiempo, se debe congelar a -20°C (o inferior). No es recomendable realizar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento, ya que puede generar resultados erróneos. En caso de utilizar muestras congeladas, éstas deben ser homogeneizadas y centrifugadas antes de su uso.

La inactivación por calor puede afectar el resultado.

No utilizar muestras con contaminación microbiana.

Si las muestras deben ser transportadas, deben embalsarse de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de material infeccioso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1- Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba.

2- Preparar el volumen necesario de buffer de lavado (1x).

3- Colocar en el soporte de tiras, el número de pocillos requeridos para la cantidad de determinaciones a realizar, incluyendo 2 pocillos para el Control Positivo (CP) y 3 para el Control Negativo (CN).

4- Dispensar el Diluyente de Muestra, luego la muestra (M) y los controles según el siguiente esquema:

	M	CP	CN
Diluyente de Muestra	50 ul	50 ul	50 ul
Control Positivo	-	50 ul	-
Control Negativo	-	-	50 ul
Muestra	50 ul	-	-

Homogeneizar mezclando 2-3 veces por carga y descarga de la micropipeta, o agitando la placa durante 10 segundos. Al adicionar la muestra, el Diluyente de Muestra virará de color de acuerdo a la tabla siguiente.

Tipo de muestra	Sin muestra	Suero o plasma	Control Positivo	Control Negativo
Color	Violeta	Celeste	Naranja oscuro	Verde

Se puede verificar la dispensación de controles o muestras a los pocillos visualmente, o mediante lectura espectrofotométrica (a 610/650 nm).

Advertencia: las muestras hemolizadas, ictericas o turbias pueden alterar el color final sin afectar los resultados. El viraje de color puede depender del volumen de muestra adicionado y de su composición. Un viraje de color de menor intensidad puede deberse a que se dispensó un volumen inferior de muestra, a que la muestra no se encuentra en las condiciones adecuadas, o a que tiene una baja concentración de proteínas.

5- Para evitar la evaporación, cubrir la placa con la cinta autoadhesiva provista, e incubar 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

6- Después de la incubación eliminar por completo el líquido de cada pocillo. Lavar 5 veces según instrucción de lavado (ver Procedimiento de Lavado).

7- Agregar el Conjugado:

Conjugado	100 ul	100 ul	100 ul
-----------	--------	--------	--------

Para evitar la evaporación cubrir la policubeta con cinta autoadhesiva.

8- Incubar 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

9- Lavar 5 veces según instrucción de lavado.

10- Preparar el Revelador (ver PREPARACION DE REACTIVOS). Dispensar el Revelador trasvasando a un recipiente limpio solamente el volumen requerido. No devolver el Revelador restante al frasco original. Evitar el contacto del reactivo con agentes oxidantes.

Revelador	100 ul	100 ul	100 ul
-----------	--------	--------	--------

11- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), protegido de la luz.

12- Agregar el Stopper:

Stopper	100 ul	100 ul	100 ul
---------	--------	--------	--------

13- Leer absorbancia en espectrofotómetro en forma bicromática a 450/620-650 nm, o monocromática a 450 nm. Nota: se recomienda realizar siempre la lectura en forma bicromática. En caso de que la lectura sea monocromática, realizar un blanco de reactivos que luego deberá ser restado de todos los valores de las muestras.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 10 minutos, por lo que los resultados deben leerse dentro de ese lapso.

PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Eliminar el líquido de los pocillos por aspirado o volcado. Los pocillos se lavan con 350 ul de buffer de lavado diluido. Asegurar que la altura alcanzada al llenar los pocillos no cause desbordes. La solución de lavado debe estar en contacto con los pocillos entre 30 y 60 segundos. Garantizar que luego del último lavado no quede líquido residual. Para ello, realice un doble aspirado para eliminar el excedente de buffer. Si persiste luego de este procedimiento, invertir la placa sobre papel absorbente y golpearla varias veces, de lo contrario podrán obtenerse resultados erróneos.

Nota: el procedimiento de lavado es crítico para el resultado del ensayo. Si queda buffer de lavado en el pocillo o los pocillos no están completamente llenos, se obtendrán resultados erróneos. No dejar que los pocillos se sequen durante el procedimiento. Los lavadores automáticos deben ser enjuagados con agua destilada o desionizada al final del día, para evitar obstrucciones o corrosiones debido a las sales presentes en el buffer de lavado.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

ETAPA	PROCEDIMIENTO	PRECAUCIONES/OBSERVACIONES
Dilución	Preparación de la solución de lavado (1x)	Disolución de los cristales de sales
Diluyente de Muestra	Agregar 50 ul de Diluyente de Muestra en cada pocillo	
Muestras	Agregar 50 ul de M, CP y CN	Se observa cambio de color al agregar la muestra y los controles.
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	En estufa
Lavado	Lavar cada pocillo con 350 ul de buffer de lavado (5 veces)	Tiempo de contacto con la solución de lavado entre 30 y 60 segundos. Eliminar completamente el líquido residual de los pocillos.

ETAPA	PROCEDIMIENTO	PRECAUCIONES/OBSERVACIONES
Conjugado	Agregar 100 ul de Conjugado	
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	En estufa
Lavado	Idem al lavado anterior	
Dilución	Preparación del Revelador 1x	Durante la incubación con el conjugado, diluir la TMB100x con el diluyente de TMB
Revelador	Agregar 100 ul de Revelador	Descartar remanente del reactivo. Evitar contacto con agentes oxidantes. No exponer a la luz.
Incubación	Durante 30 ± 2 minutos entre $18-25^\circ\text{C}$	Mantener los pocillos protegidos de la luz
Detención	Agregar 100 ul de Stopper	
Lectura	Leer en espectrofotómetro	Leer dentro de los 10 minutos

CRITERIOS DE VALIDACION DEL ENSAYO

El ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

1- El promedio de las absorbancias de los Controles Negativos debe ser menor o igual a 0,150

Ejemplo:

Lectura 1 = 0,060 Lectura 2 = 0,055, Lectura 3 = 0,070

Promedio = $(0,060 + 0,055 + 0,070)/3 = 0,055$

2- Eliminar cualquier Control Negativo con absorbancia mayor a 0,150

3- Si se ha eliminado algún Control Negativo, calcular nuevamente el promedio de los Controles Negativos. Un ensayo es válido si se aceptan al menos dos de los Controles Negativos.

4- El promedio de las absorbancias de los Controles Positivos debe ser mayor a 0,900.

Ejemplo:

Lectura 1 = 1,358, Lectura 2 = 1,214

Promedio = $(1,358 + 1,214)/2 = 1,286$

5- La diferencia entre el promedio de las absorbancias de los Controles Positivos y Controles Negativos debe ser mayor o igual a 0,750.

Si una de estas condiciones no se cumple, repetir el ensayo. Recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-HTLV I y/o II se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del Cut-off.

Cut-off = CN + 0,200

CN: promedio de las absorbancias del Control Negativo

Ejemplo: $0,035 + 0,200 = 0,235$

Muestras No Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias menores al Cut-off.

Muestras Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias mayores o iguales al Cut-off.

Toda muestra inicialmente reactiva debe ser repetida por duplicado. Si una o ambas repeticiones dan reactivas, la misma debe considerarse reactiva.

Una muestra inicialmente reactiva puede ser no reactiva en las dos repeticiones. Esto puede deberse a:

- Contaminación cruzada de un pocillo no reactivo por una muestra reactiva.
- Contaminación de la muestra durante la dispensación, imprecisión en el dispensado de muestra, conjugado y/o Revelador en el pocillo.
- Reutilización de tips.
- Contaminación del pocillo con hipoclorito u otros agentes oxidantes.

En ciertos casos una muestra no reactiva puede presentar una reacción falsamente reactiva, tanto en el análisis inicial como en sus repeticiones. Algunas causas de este fenómeno pueden ser:

- Contaminación de la muestra durante la extracción, procesamiento o conservación.
- Presencia de sustancias interferentes, tales como autoanticuerpos, fármacos, etc.
- Dispensación y/o aspirado ineficiente de la solución de lavado (sistema obstruido).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias Interferentes conocidas en Muestra.

No se debe utilizar pool de muestras.

No se deben emplear otros fluidos corporales como la saliva, líquido cefalorraquídeo u orina.

Las muestras repetidamente reactivas deberán analizarse por técnicas suplementarias o confirmatorias, según norma vigente en el país.

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DE DESEMPEÑO

a) Sensibilidad

Sensibilidad en Paneles de Performance

En un estudio realizado sobre diferentes paneles comerciales internacionales, se obtuvieron los siguientes resultados:

PRP205(M) (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel Modified, BBI, USA) se detectaron 18 de las 18 muestras reactivas.

PRP206 (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel, Panel, BBI, USA) se detectaron 14 de las 14 muestras reactivas.

PRP207 (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel, BBI, USA) se detectaron 14 de las 14 muestras reactivas.

QRP 712 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE, USA) se detectaron 5 de las 5 muestras reactivas.

QRP 751 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE, USA) se detectaron 4 de las 4 muestras reactivas.

QRP 761 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE, USA) se detectaron 5 de las 5 muestras reactivas.

Sensibilidad clínica en Paneles de muestras reactivas anti-HTLV I y/o II

En un estudio realizado sobre 47 muestras con infección por HTLV I y/o II, confirmada por diferentes métodos, se encontraron reactivas con el kit HTLV I+II ELISA recombinante v.4.0 la totalidad de las muestras.

b) Especificidad

En un estudio realizado sobre 921 muestras de sueros de diferentes centros de salud de la ciudad de Rosario, se encontró una especificidad del 99.67%.

En otro estudio de 1048 muestras de plasmas de diferentes centros de salud de la ciudad de Rosario, se encontró una especificidad de 100 %.

Se estudió la posible aparición de reactividad cruzada ensayando 184 muestras provenientes de individuos con diferentes condiciones clínicas que podrían ser causantes de reacciones inespecíficas para el ensayo HTLV I+II ELISA recombinante v.4.0. Este grupo incluía muestras:

- con anticuerpos contra HAV, HBV, EBV, CMV, HSV, VZV, HIV, Chagas y otros virus.
- con diferentes autoanticuerpos (AGA, AMA, ATA, FAN, factor reumatoideo y otros).
- con anticuerpos contra *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Trypanosoma cruzi*, y otros microorganismos.
- de pacientes hemodializados y mujeres embarazadas.

La especificidad obtenida para esta población fue de 100%.

c) Precisión

Se evaluó la precisión de la prueba siguiendo el protocolo EP15-A recomendado por la NCCLS. Los ensayos fueron realizados con muestras de diferentes niveles de reactividad en el HTLV I y II y con los controles. Se realizaron 2 ensayos diarios evaluando cada muestra por cuadruplicado y por el transcurso de 5 días.

	Media	Intra-ensayo		Total	
	IP (DO/CO)	S	CV	S	CV
Muestra 1	1,25	0,071	5,72%	0,094	7,57%
Muestra 2	1,54	0,083	5,42%	0,090	5,86%
Muestra 3	3,38	0,149	4,41%	0,177	5,25%
Muestra 4	5,21	0,177	3,39%	0,239	4,58%
Muestra 5	2,80	0,076	2,72%	0,127	4,53%
Muestra 6	1,39	0,056	4,03%	0,092	6,62%
Control Positivo	9,32	0,352	3,77%	0,460	4,94%
Control Negativo	0,10	0,010	9,64%	0,017	17,05%

n= 20

PRESENTACION

Kit para 96 determinaciones (Cód. 1671096)

Kit para 192 determinaciones (Cód. 1681192)

BIBLIOGRAFIA

- Feuer G, Green PL. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24(39):5996-6004 (2005).
- Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* 3:144-54. (2004).
- Poiesz BJ, Poiesz MJ, Choi D. The human T-cell lymphoma/leukemia viruses. *Cancer Invest* 2 :253-77. (2003)
- Gotuzzo E, Arango C, de Queiroz-Campos A, Istúriz RE. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North Am.* 14(1):21 1-39, x-xi (2000).
- User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy – Approved Guideline EP15-A (2001).
- Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline I/LA21-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline EP7-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Richard Malan, Carolina A. Berini2. Seroprevalencia de HTLV-1/2 en donantes de sangre de la provincia de Misiones. *Medicina* (Buenos Aires) 2009; 69: 71-74
- Nadia C. Santos Quispe, Edwin Bengoa Fera, Elizabeth de los Santos-Fortuna and Adele Caterino-de-Araujo. Confirming the presence of hTLV-1 infection and the absence of HTLV-2 in blood donors from Arequipa, Perú. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 51(1):25-29, 2009.
- Anna Abrams, Yoshimi Akahata and Steven Jacobson. The Prevalence and Significance of HTLV-I/II Seroindeterminate Western Blot Patterns. *Viruses* 2011, 3, 1320-1331.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta	Sensib.
------------	---------

Policubeta sensibilizada

Conjugado

Conjugado

TMB

TMB

Control	+
---------	---

Control Positivo

Stopper

Stopper

Diluyente	Muestra
-----------	---------

Diluyente de Muestra

TMB	Diluy.
-----	--------

Diluyente de TMB

Buf. Lavado	Conc.
-------------	-------

Buffer de Lavado Concentrado

Control	-
---------	---

Control Negativo



HTLV I+II

ELISA recombinate v.4.0

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos contra os vírus HTLV I e II

SIGNIFICADO CLÍNICO

Os vírus linfotrópicos de células T humanas tipo HTLV pertencentes à família dos retrovírus, dividem-se em dois tipos: HTLV-I e HTLV-II. Estão associados a enfermidades malignas das células T e a processos neurológicos degenerativos.

O HTLV-I é o causante etiológico de dois tipos de patologias: a leucemia de células T de adulto (ATL) e diversos transtornos neurológicos de desmielinização que incluem a mielopatia associada a HTLV-I (HAM) e a paraparesia espástica tropical (TSP). Também são detectados anticorpos específicos contra HTLV-I em alguns casos de dermatite, uveíte, polimiosite e artrite.

O HTLV-II é associado a síndromes neurológicas semelhantes à HAM.

Ambos vírus são transmitidos por contato sexual, exposição a sangue contaminado, transfusão ou transmissão de uma mãe infectada ao feto durante o período pré-natal ou através da leite materna.

O ensaio **HTLV-I+II ELISA recombinate v.4.0** está desenvolvido para detectar anticorpos tanto contra HTLV-I como contra HTLV-II. Pode ser utilizado no diagnóstico da infecção e no controle de unidades de doadores em bancos de sangue.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

As cubetas da policubeta estão recobertas com antígenos recombinantes dos vírus HTLV I e II. A amostra diluída é incubada nas cubetas. Se os anticorpos contra um dos vírus estiver presente na amostra, eles serão unidos aos antígenos na cubeta. O material não unido é removido por lavagem. No passo seguinte é adicionado o conjugado que consiste em antígenos de HTLV I e HTLV II conjugado com peroxidase. Este conjugado é unido aos complexos antígeno-anticorpo formados com anterioridade. O conjugado não unido é removido por lavagem. A seguir, é adicionada uma solução contendo tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. As amostras reativas desenvolvem cor azul claro que vira ao amarelo quando a reação é detida com ácido sulfúrico (Stopper).

REAGENTES FORNECIDOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removíveis com 96 cubetas recobertas com antígenos recombinantes dos vírus HTLV-I e II.

Diluyente de Amostra: tampão salino com tensioativo. Cor violeta.

Conjugado: antígenos de HTLV I e HTLV II conjugados com peroxidase. Cor vermelha.

TMB: solução de tetrametilbenzidina 36 Mm em dimetilsulfoxido (DMSO) 100%.

Diluyente de TMB: tampão citrato 40 mM e peróxido de hidrogênio 1,27 mM, pH 4,3.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Tampão de Lavagem Concentrado: tampão salino com tensioativo (25x). Cor verde.

Controle Positivo: soro humano inativado contendo anticorpos contra HTLV-I e/ou HTLV-II. Cor laranja.

Controle Negativo: soro humano não reativo, inativado. Cor amarela.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

Água destilada ou desionizada.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipetas para medir os volumes indicados
- Tips descartáveis
- Material volumétrico para preparar as diluições indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorvente
- Luvas descartáveis
- Relógio alarme ou cronômetro
- Hipoclorito de sódio
- Sistema de lavagem de policubetas (manual ou automático)
- Espectrofotômetro para leitura de policubetas

PRECAUÇÕES

- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como se fossem capazes de transmitir a infecção. Os controles estão inativados. No entanto devem ser usados como se tratando de material infectante.
- Os soros controles foram examinados para antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg) e anticorpos contra o vírus da hepatite C (HCV), encontrando-se não reativos. Devido ao alto nível de infecção simultânea por HIV, certos controles reativos para HTLV I+II podem resultar também reativos para HIV. É recomendável manipulá-los com as precauções para amostras potencialmente infectantes.
- Todos os materiais utilizados no ensaio devem ser descartados antes de serem descartados, a fim de assegurar a inativação de agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é autoclavar durante 1 hora a 121°C. Os líquidos descartados podem ser desinfetados com hipoclorito de sódio, (concentração final de 5%) durante pelo menos 60 minutos.
- Evitar que os vapores de hipoclorito provenientes dos

recipientes de descarte biológicos ou outras formas entrem em contato com os reagentes, pois o hipoclorito afeta a reação.

- Evitar o derrame de líquidos e a formação de aerossóis.
- Não utilizar os reagentes após a data de vencimento.
- Não intercambiar reagentes de kits ou lotes diferentes ou modificar os procedimentos do ensaio.
- Não utilizar reagentes de outra origem.
- Evitar o contato das paredes das cubetas com os tips.
- Não utilizar elementos metálicos que possam entrar em contato com os reagentes.
- As policubetas devem ser incubadas em estufa. Não usar banho-maria. Evitar abrir a estufa durante a incubação.
- O ácido sulfúrico (Stopper) é corrosivo. H315+H320 Provoca irritação cutânea e ocular. H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P262 Não pode entrar em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
- Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis e proteção nos olhos durante a manipulação das amostras e reagentes do ensaio.
- A TMB é sensível à luz. Manter o frasco fechado quando não utilizar.
- Todos os reagentes e as amostras devem-se descartar conforme à regulação local vigente.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É importante que todo o material utilizado para a preparação dos reagentes, esteja limpo e livre de detergente e hipoclorito.

Tampão de Lavagem: a baixa temperatura os componentes do reagente concentrado podem precipitar. Neste caso, esquentar a solução a 37°C até a sua dissolução completa. Para a obtenção do tampão de lavagem pronto para uso (1x), diluir uma parte do Tampão de Lavagem Concentrado (25x) com 24 partes de água destilada ou desionizada. Ex.: 20 ml com 480 ml para uma policubeta.

Revelador: num tubo rotulado, diluir a TMB concentrada (100x) em Diluente de TMB. Ex.: 200 µl em 20 ml para uma policubeta. A TMB concentrada está dissolta em DMSO. Desde que a temperatura de fusão do DMSO é 18°C, a TMB deve atingir temperatura ambiente (20-25°C) e deve ser homogeneizada muito bem antes de usar.

Policubeta sensibilizada, Diluente de Amostra, Conjugado, Stopper, Controle Positivo e Controle Negativo: prontos para uso.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os Reagentes Fornecidos são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

Tampão de Lavagem Concentrado e Stopper: conservar a temperatura entre 2 e 25°C.

Tampão de Lavagem (1x): conservar em recipiente fechado. É estável 3 meses a temperatura entre 2 e 25°C.

Policubeta sensibilizada: não abrir a embalagem até o momento de uso, e esperar atingir a temperatura ambiente, pois ao contrário se favorecerá a condensação de umidade na superfície das cubetas. As tiras de cubetas não utilizadas devem ser conservadas dentro do envelope com o dessecante, fechado e mantida entre 2-10°C. As tiras conservadas nestas condições podem ser utilizadas dentro dos 4 meses posteriores sempre que não seja ultrapassada a data de vencimento do kit.

Revelador: uma vez preparada deve ser utilizada no prazo de 3 horas, mantendo-o no ambiente (2-25°C) e protegida da luz. No caso de coloração deve ser descartado.

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta da amostra: obter da maneira habitual.

b) Aditivos: não são necessários para soro. As amostras de plasma podem ser coletadas com heparina, citrato, fluoreto ou EDTA como anticoagulante.

c) Substâncias interferentes conhecidas: não são observadas interferências por bilirrubina até 30 mg/dl, ácido ascórbico até 50 mg/dl, triglicerídeos até 750 mg/dl ou hemoglobina até 300 mg/dl. As amostras que contêm partículas devem ser clarificadas por centrifugação.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra pode-se conservar sob refrigeração (2-10°C) por até 3 dias. Caso seja necessário mantê-lo por mais tempo, conservar a -20°C ou menos. Não é recomendável realizar vários ciclos de congelamento e descongelamento, já que pode produzir resultados errôneos. Caso serem utilizadas amostras congeladas, devem ser homogeneizadas e centrifugadas antes de seu uso.

A inativação pelo calor pode alterar o resultado.

Não utilizar amostras com contaminação microbiana.

Caso as amostras devam ser transportadas, embalar conforme as especificações legais referentes ao transporte de material infeccioso.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1- Levar os reagentes e as amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova.

2- Preparar o volume necessário de Tampão de Lavagem (1x).

3- Colocar no suporte de tiras, o número de cubetas requeridas para a quantidade de determinações a realizar, incluindo 2 cubetass para o Controle Positivo (CP) e 3 para o Controle Negativo (CN).

4- Colocar o Diluente de Amostra, após a amostra (A) e os controles, segundo o seguinte esquema:

	A	CP	CN
Diluente de Amostra	50 µl	50 µl	50 µl
Controle Positivo	-	50 µl	-
Controle Negativo	-	-	50 µl
Amostra	50 µl	-	-

Homogeneizar misturando 2-3 vezes por carga e descarga da micropipeta ou agitando a placa durante 10 segundos. Ao adicionar a amostra, o Diluente de Amostra mudará de cor, segundo a tabela seguinte:

Tipo de amostra	Sem amostra	Soro ou plasma	Controle Positivo	Controle Negativo
Cor	Violeta	Azul claro	Alaranjado escuro	Verde

Pode-se verificar a colocação dos controles e amostras às cubetas visualmente ou mediante leitura espectrofotométrica (a 610/650 nm).

Advertência: as amostras hemolisadas, icterícoas ou com turbidez, podem mudar a cor final sem alterar os resultados. A mudança da cor pode depender do volume de amostra acrescentado e da sua composição. Uma viragem da cor de menor intensidade pode-se dever a uma menor quantidade de amostra, a que a mesma não esteja nas condições apropriadas, ou que tenha um nível baixo de proteínas.

5- Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com a fita auto-adesiva fornecida, e incubar 30 ± 2 minutos a 37 ± 1°C.

6- Após da incubação, eliminar completamente o líquido de cada cubeta. Lavar 5 vezes seguindo as instruções de lavagem (vide PROCEDIMENTO DE LAVAGEM).

7- Acrescentar o Conjugado:

Conjugado	100 ul	100 ul	100 ul
-----------	--------	--------	--------

Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com fita auto-adesiva.

8- Incubar 30 ± 2 minutos a 37 ± 1°C.

9- Lavar 5 vezes segundo as instruções de lavagem.

10- Preparar o Revelador (vide PREPARAÇÃO DE REAGENTES) transvasando a um recipiente limpo apenas o volume necessário de Revelador. Não voltar o Revelador remanescente ao frasco original. Evitar o contato do reagente com agentes oxidantes.

Revelador	100 ul	100 ul	100 ul
-----------	--------	--------	--------

11- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), ao abrigo da luz.

12- Acrescentar o Stopper:

Stopper	100 ul	100 ul	100 ul
---------	--------	--------	--------

13- Ler a absorbância em espectrofotômetro em forma bicromática a 450/620-650 nm ou monocromática a 450 nm.

Nota: recomenda-se realizar sempre a leitura em forma bicromática. Caso a leitura for monocromática, realizar um branco de reagentes que deverá ser subtraído das leituras das amostras.

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor da reação é estável durante 10 minutos, portanto os resultados devem-se observar dentro desse lapso.

PROCEDIMENTO DE LAVAGEM

Eliminar o líquido das cubetas por aspiração ou inversão. As cubetas lavam-se com 350 ul de Tampão de Lavagem diluído. Assegurar-se que a altura alcançada ao encher as cubetas não cause desbordos.

A solução de lavagem deve permanecer em contato com as cubetas entre 30 e 60 minutos.

Garanta-se que após da última lavagem não fique líquido residual. Realize-se um dobre aspirado para eliminar o excesso de tampão. Caso de persistir após este procedimento, inverter a policubeta acima do papel absorvente e batê-la várias vezes a fim evitar resultados errôneos.

Nota: o procedimento de lavagem é crítico para o resultado do ensaio. Se ficar tampão de lavagem nas cubetas ou se as mesmas não estão completamente cheias, obterão-se resultados errôneos. Não deve-se deixar as cubetas secar durante o procedimento. As lavadoras automáticas devem-se enxaguar com água destilada ou desionizada ao final do dia para evitar obstruções pelas sais presentes no tampão de lavagem.

RESUMO DO PROCEDIMENTO

ESTÁGIO	PROCEDIMENTO	PRECAUÇÕES/OBSERVAÇÕES
Diluição	Preparação da solução de lavagem (1x)	Dissolução dos cristais de sais
Diluyente de Amostra	Acrescentar 50 ul de Diluyente de Amostra em cada cubeta	
Amostras	Acrescentar 50 ul de A, CP e CN	Observa-se mudança de cor quando acrescentar a amostra e os controles.
Incubação	Cobrir as cubetas e incubar durante 30 ± 2 minutos a 37 ± 1°C	Em estufa
Lavagem	Lavar cada cubeta com 350 ul de tampão de lavagem (5 vezes)	Tempo de contato com a solução de lavagem entre 30 e 60 segundos. Eliminar completamente o líquido residual das cubetas.

ESTÁGIO	PROCEDIMENTO	PRECAUÇÕES/OBSERVAÇÕES
Conjugado	Acrescentar 100 ul de Conjugado	
Incubação	Cobrir as cubetas e incubar durante 30 ± 2 minutos a 37 ± 1°C	Em estufa
Lavagem	Idem à lavagem anterior	
Diluição	Preparação do Revelador (1x)	Durante a incubação com o Conjugado, diluir a TMB 100x com o diluente de TMB
Revelador	Acrescentar 100 ul de Revelador	Descartar o reagente remanescente. Evitar o contato com agentes oxidantes. Não expor à luz.
Incubação	Durante 30 ± 2 minutos entre 18-25°C	Manter as cubetas ao abrigo da luz
Detenção	Acrescentar 100 ul de Stopper	
Leitura	Ler em espectrofotômetro	Ler dentro dos 10 minutos

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DA CORRIDA

O ensaio é considerado válida se cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

1- O promédio das absorbâncias dos Controles Negativos deve ser $\leq 0,150$.

Exemplo:

Leitura 1 = 0,060; Leitura 2 = 0,055; Leitura 3 = 0,070

Promédio = $(0,060 + 0,055 + 0,070) / 3 = 0,055$

2- Eliminar qualquer Controle Negativo com D.O. $> 0,150$

3- Se eliminar algum Controle Negativo, voltar a calcular o promédio dos Controles Negativos. Um ensaio é válido se aceitam-se pelo menos dois dos Controles Negativos.

4- O promédio das absorbâncias dos Controles Positivos deve ser $> 0,900$.

Exemplo:

Leitura 1 = 1,358; Leitura 2 = 1,214

Promédio = $(1,358 + 1,214) / 2 = 1,286$

5- A diferença entre o promédio das absorbâncias dos Controles Positivos e Controles Negativos deve ser $\geq 0,750$.

Se uma destas condições não se cumprirem, repetir o ensaio.

Lembrar que as leituras obtidas dependerão da sensibilidade do analisador utilizado.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A presença ou ausência de anticorpos anti-HTLV-I e/ou II é determinada relacionando a absorbância da amostra em relação ao valor Cut-off.

Cut-off = CN + 0,200

CN: promédio das abosorbâncias do Controle Negativo.

Exemplo: $0,035 + 0,200 = 0,235$

Amostras Não Reativas: consideram-se aquelas com absorbâncias menores que o Cut-off.

Amostras Reativas: consideram-se aquelas com absorbâncias maiores ou iguais que o Cut-off.

As amostras inicialmente reativas devem ser analisadas novamente por duplicado. Se uma ou ambas repetições resultam reativas, a mesma é considerada reativa.

Uma amostra inicialmente reativa pode ser não reativa nas duas repetições. Isto pode ser devido à:

- Contaminação cruzada de uma cubeta não reativo por uma amostra reativa.
- Contaminação da amostra durante a dispensação, imprecisão no dispensado da amostra, Conjugado e/ou Revelador na cubeta.
- Reutilização de ponteiras.
- Contaminação do poço com hipoclorito ou outros agentes oxidantes.

Em certos casos, uma amostra não reativa pode apresentar uma reação falsamente reativa, tanto na análise inicial como em suas repetições. Algumas causas destes fenômenos podem ser:

- Contaminação de uma amostra durante sua extração, processamento ou conservação.
- Presença de substâncias interferentes, tais como auto-anticorpos, fármacos, etc.
- Dispensação e / ou aspiração ineficiente da solução de lavagem (sistema obstruído).

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. Não utilizar pool de amostras.

Não utilizar outros fluidos corporais como a saliva, líquido cefalorraquidiano ou urina.

As amostras repetidamente reativas devem ser analisadas por técnicas suplementares ou confirmatórias, segundo a norma vigente no país.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

a) Sensibilidade

Sensibilidade clínica

Sensibilidade clínica em Painéis de Performance

Em um estudo realizado com diferentes painéis comerciais internacionais, obtiveram-se os seguintes resultados:

PRP205(M) (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel Modified, BBI, USA) foram detectadas 18 das 18 amostras reativas.

PRP206 (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel, Panel, BBI, USA) foram detectadas 14 das 14 amostras reativas.

PRP207 (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel, BBI, USA) foram detectadas 14 das 14 amostras reativas.

QRP 712 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE, USA) foram detectadas 5 das 5 amostras reativas.

QRP 751(Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE, USA) foram detectadas 4 das 4 amostras reativas.

QRP 761 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE, USA)) foram detectadas 5 das 5 amostras reativas.

Sensibilidade clínica em Painéis de amostras reativas anti-HTLV-I+II

Em um estudo realizado com 47 amostras com infecção por HTLV I e/ou II confirmada por diferentes métodos, encontraram-se reativas a totalidade das amostras com o kit HTLV I+II ELISA recombinante v.4.0.

Sensibilidade clínica em amostras verdadeiramente positivas

A sensibilidade clínica do ensaio HTLV I+II recombinante v.4.0 foi avaliada utilizando 57 amostras verdadeiramente positivas para HTLV-I/II, previamente caracterizadas por método comercial de referência. Todas as amostras foram corretamente identificadas como reativas pelo ensaio, resultando em sensibilidade clínica de 100% no conjunto analisado.

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do ensaio HTLV I+II recombinante v.4.0 foi avaliada por meio de diluições seriadas de amostras positivas. Todas as amostras testadas mantiveram reatividade até a diluição de 1/512. A maioria permaneceu detectável até 1/1024, e algumas amostras apresentaram reatividade em diluições mais elevadas, chegando a 1/4096 ou superiores, dependendo do título inicial. Esses resultados demonstram que o ensaio possui elevada sensibilidade para detecção de anticorpos contra HTLV-I e HTLV-II.

b) Especificidade

Em um estudo realizado com 921 amostras de soros de diferentes centros de saúde da cidade de Rosario, obteve-se uma especificidade de 99,67%.

Em outro estudo com 1048 amostras de plasmas diferentes centros de saúde da cidade de Rosario, encontrou-se uma especificidade de 100%.

Estudou-se a possível presença de reatividade cruzada ensaiando 184 amostras provenientes de indivíduos com diferentes condições clínicas que podem ser causa de reações inespecíficas para o ensaio HTLV-I+II ELISA recombinante

v.4.0. Estas condições incluem amostras:

- com anticorpos contra HAV, HBV, EBV, CMV, HSV, VZV, HIV, Chagas e outros vírus;
 - com diferentes auto-anticorpos (AGA, AMA, ATA, FAN, fator reumatóide e outros).
 - com anticorpos contra *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Trypanosoma cruzi* e outros microorganismos.
 - de pacientes hemodializados e mulheres grávidas.
- A especificidade obtida para esta população foi 100%.

c) Precisão

Avaliou-se a precisão da prova seguindo o protocolo EP15-A recomendado pela NCCLS. Os ensaios foram realizados com amostras de diferentes níveis de reatividade com HTLV-I e II e com os controles. Realizaram-se 2 ensaios diários avaliando cada amostra em quadruplicado durante 5 dias.

	Média	Intra-ensaio		Total	
	IP (DO/CO)	S	CV	S	CV
Amostra 1	1,25	0,071	5,72%	0,094	7,57%
Amostra 2	1,54	0,083	5,42%	0,090	5,86%
Amostra 3	3,38	0,149	4,41%	0,177	5,25%
Amostra 4	5,21	0,177	3,39%	0,239	4,58%
Amostra 5	2,80	0,076	2,72%	0,127	4,53%
Amostra 6	1,39	0,056	4,03%	0,092	6,62%
Controle Positivo	9,32	0,352	3,77%	0,460	4,94%
Controle Negativo	0,10	0,010	9,64%	0,017	17,05%

n= 20

APRESENTAÇÃO

Kit para 96 determinações (Cód. 1671096)

Kit para 192 determinações (Cód. 1681192)

REFERÊNCIAS

- Feuer G, Green PL. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24(39):5996-6004 (2005).
- Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* 3:144-54. (2004).
- Polesz BJ, Polesz MJ, Choi D. The human T-cell lymphoma/leukemia viruses. *Cancer Invest* 2 :253-77. (2003)
- Gotuzzo E, Arango C, de Queiroz-Campos A, Istúriz RE. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North Am.* 14(1):21 1-39, x-xi (2000).
- User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy – Approved Guideline EP15-A (2001).
- Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline I/LA21-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline EP7-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Richard Malan, Carolina A. Berini². Seroprevalencia de HTLV-1/2 en donantes de sangre de la provincia de Misiones. Medicina (Buenos Aires) 2009; 69: 71-74
- Nadia C. Santos Quispe, Edwin Bengoa Fera, Elizabeth de los Santos-Fortuna and Adele Caterino-de-Araujo. Confirming the presence of HTLV-1 infection and the absence of HTLV-2 in blood donors from Arequipa, Perú. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 51(1):25-29, 2009.
- Anna Abrams, Yoshimi Akahata and Steven Jacobson. The Prevalence and Significance of HTLV-I/II Seroindeterminate Western Blot Patterns. Viruses 2011, 3, 1320-1331.

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Policubeta	Sensib.
-------------------	----------------

Policubeta sensibilizada

Diluyente	Muestra
------------------	----------------

Diluyente de Amostra

Conjugado

Conjugado

TMB	Diluy.
------------	---------------

Diluyente de TMB

TMB

TMB

Buf. Lavado	Conc.
--------------------	--------------

Tampão de Lavagem Concentrado

Control	+
----------------	----------

Controle Positivo

Control	-
----------------	----------

Controle Negativo

Stopper

Stopper



HTLV I+II

ELISA recombinante v.4.0

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to HTLV I & II viruses

SUMMARY

The lymphotropic viruses from human T cells, HTLV type that belong to the family of retroviruses are divided into two types: HTLV-I and HTLV-II. They are associated with malignant T cells diseases and degenerative neurological processes.

The HTLV-I is the etiological cause of two types of pathologies: adult T-cell leukemia (ATL) and various neurological disorders involving demyelination including myelopathy associated to HTLV-I (HAM) and tropical spastic paraparesis (TSP). Also specific HTLV-I antibodies are detected in certain cases of dermatitis, uveitis, polymyositis, and arthritis.

HTLV-II has been associated with neurological syndromes similar to HAM.

Both viruses are transmitted by sexual contact, exposure to contaminated blood transfusion, or transmission from an infected mother to fetus during the prenatal period or by breast milk.

The **HTLV I+II ELISA recombinante v.4.0** kit is designed to detect HTLV-I and HTLV-II antibodies. It may be used in the diagnosis of infection and donor units control in blood banks.

PRINCIPLE

The microtitration plate wells are coated with the recombinant antigens to HTLV I&II viruses. The diluted sample is incubated in the wells. If antibodies against one of the viruses are present in the sample, they bind to the antigen well. The unbound fraction is removed by washing. In the next step the conjugate is added, consisting of HTLV I and HTLV II antibodies conjugated to peroxidase. It binds to the antigen-antibody complexes previously formed. The unbound conjugate is removed by washing. Then, a solution containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide is added. Reactive samples develop a light-blue color that changes to yellow when the reaction is stopped with sulfuric acid (Stopper).

PROVIDED REAGENTS

Coated microtitration plate: microtitration plate with cut-out strips and 96 wells coated with HTLV I&II recombinant antigens.

Sample Diluent: saline buffer with surfactant. Violet color.

Conjugate: antigens anti-HTLV I and HTLV II conjugated to peroxidase. Red color.

TMB: 36 mM tetramethylbenzidine solution in 100% dimethylsulphoxide (DMSO), (100x).

TMB diluent: 40 mM citrate buffer and 1.27 mM hydrogen peroxide, pH 4.3.

Stopper: 2 N sulfuric acid.

Concentrated Wash Buffer: saline buffer with surfactant (25x). Green color.

Positive Control: inactivated human serum containing antibodies to HTLV I and/or HTLV II. Orange color.

Negative Control: inactivated non-reactive human serum. Yellow color.

NON-PROVIDED REAGENTS

Distilled or deionized water.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Micropipettes for measuring stated volumes
- Disposable tips
- Volumetric material to prepare stated dilutions
- 37°C incubator
- Absorbent paper
- Disposable gloves
- Timer or stopwatch
- Sodium hypochlorite
- Microtitration plate washing system (manual or automatic)
- Spectrophotometer for microtitration plate reading

WARNINGS

- The reagents are for "in vitro" diagnostic use.
- All patient samples should be handled as capable of transmitting infection. The controls are inactivated. However, they should be used as infective material.
- The control sera have been tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) and found to be non-reactive. Due to the high level of HIV co-infection, certain reactive controls for HTLV I+II can also be reactive for HIV. Thus, they should be handled as potentially infectious material.
- All materials used to perform the test must be treated to ensure the inactivation of pathogenic agents. The recommended method is autoclaving for one hour at 121°C. Liquid waste may be disinfected with sodium hypochlorite (5% final concentration) for at least 60 minutes.
- Avoid contact of reagents with hypochlorite fumes from biohazards disposal containers or other sources, since hypochlorite affects the reaction.
- Avoid liquid spilling and aerosol formation.
- Do not use the reagents after the expiration date.
- Do not exchange reagents from different lots and do not modify assay procedures.
- Do not use reagents from other origin.
- Avoid touching the walls of the wells with the tips.
- Avoid using metal objects that may be in contact with the reagents.

- The microtitration plates should be placed in incubator. Do not use water bath. Do not open the incubator during this process.
- Sulfuric acid (Stopper) is corrosive. H315+H320: Causes skin and eye irritation. H314: Causes severe skin burns and eye damage. P262: Do not get in eyes, on skin, or on clothing. P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
- Do not pipette by mouth. Use disposable gloves and eye protection during test sample and reagent handling.
- TMB is sensitive to light. Keep the bottle capped when unused.
- All reagents and samples should be discarded according to current regulations.

REAGENTS PREPARATION

All the material used for reagent preparation should be clean and free from detergent and hypochlorite.

Wash Buffer: constituents of the concentrated reagent may precipitate at low temperature. In such case, bring the solution to 37°C until complete dissolution. To obtain a ready-to-use wash buffer (1x) dilute 1 part Concentrated Wash Buffer (25x) with 24 parts distilled or deionized water. Example: 20 ml with 480 ml for one microtitration plate.

Substrate: in a labeled tube, dilute the concentrated TMB (100x) in TMB Diluent. E.g. 200 µl in 20 ml for a microtitration plate. Concentrated TMB is dissolved in DMSO. Since the melting temperature of the DMSO is 18 °C the TMB must reach room temperature (20-25 °C) and be completely homogenized before use.

Coated microtitration plate, Sample Diluent, Conjugate Diluent, Substrate, Stopper, Negative and Positive Controls: ready to use.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Provided Reagents are stable in refrigerator (2-10 °C) until expiration date stated on the box. Do not freeze.

Concentrated Wash Buffer and Stopper: store at room temperature (2-25 °C).

Wash Buffer (1x): store in sealed container. Stable for 3 months at room temperature (2-25 °C).

Coated microtitration plate: do not open the pouch until performing the test and until it has reached room temperature. Otherwise, the well strip surface could get moistened. Unused well strips should be kept in the pouch with the desiccant, sealed with adhesive tape and stored at 2-10 °C. Test strips stored in this manner are stable for 4 months if they do not exceed the date printed on the pouch label.

Substrate: once prepared it should be used within 3 hours keeping it protected from light at room temperature (2-25 °C). Discard if coloration is observed.

SAMPLE

Serum or plasma

a) Sample collection: obtain in the usual way.

b) Additives: not required for serum. Use plasma collected

with heparin, citrate, fluoride or EDTA as anticoagulants.

c) Known interfering substances: no interference has been observed with bilirubin up to 30 mg/dl, ascorbic acid up to 50 mg/dl, triglycerides up to 750 mg/dl, hemoglobin up to 300 mg/dl. Samples containing particles should be clarified by centrifugation.

d) Stability and storage instructions: sample should be stored refrigerated (2-10°C) up to 3 days. If extended storage periods are required, samples should be frozen at -20°C (or less). Samples should not be repeatedly frozen and thawed. This may lead to erroneous results. In case of using frozen samples, they should be homogenized and centrifuged before use.

Heat inactivation may affect the result.

Do not use samples with microbial contamination.

If samples are to be transported, they should be packaged according to local regulations for biohazard material shipment.

TEST PROCEDURE

1- Bring the reagents and samples to room temperature before starting the test.

2- Prepare the necessary volume of Wash Buffer (1x).

3- Place the required wells in the strip holder for the number of determinations to be used, including 2 wells for Positive Control (PC) and 3 for Negative Control (NC).

4- Dispense the Sample Diluent, then the sample (S) and the controls according to the following scheme:

	M	PC	NC
Sample Diluent	50 µl	50 µl	50 µl
Positive Control	-	50 µl	-
Negative Control	-	-	50 µl
Sample	50 µl	-	-

Homogenize 2-3 times by loading and unloading the micropipette or shaking the plate for 10 seconds. When adding the sample, the Sample Diluent will change color (see table).

Sample type	Without sample	Serum or plasma	Positive Control	Negative Control
Color	Violet	Light blue	Dark orange	Green

Control or sample dosing to the wells may be visually or spectrophotometrically verified (at 610/650 nm).

Warning: turbid, icteric or hemolyzed samples may change the final color without affecting the results. Color change may depend on the added sample volume and its composition. A less intense color change may be due to a lower dispensed sample volume, the sample not being in the appropriate conditions, or a low protein level.

5- To avoid evaporation, cover the plate with the provided adhesive tape and incubate for 30 ± 2 minutes at 37 ± 1°C.

6- The liquid from each well must be thoroughly removed after incubation. Wash 5 times according to washing instructions (see WASHING PROCEDURE).

7- Add the Conjugate:

Conjugate	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

To avoid evaporation cover the microplate with adhesive tape.

8- Incubate for 30 ± 2 minutes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

9- Wash 5 times according to the washing instructions.

10- Prepare de Substrate (See REAGENT PREPARATION). Dispense the Substrate. Transfer only the required Substrate volume to a clean recipient. Do not transfer the remaining Substrate back to the original bottle. Avoid reagent contact with oxidizing agents.

Substrate	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

11- Incubate for 30 ± 2 minutes at room temperature ($18-25^\circ\text{C}$), protecting from light.

12- Add the Stopper:

Stopper	100 ul	100 ul	100 ul
----------------	--------	--------	--------

13- Read absorbance in spectrophotometer monochromatically at 450 nm or bichromatically at 450/620-650 nm.

Note: bichromatic reading is recommended. In case the reading is monochromatic, perform a reagent blank that will have to be subtracted from all sample values.

STABILITY OF THE FINAL REACTION

Reaction color is stable for 10 minutes. Thus, results should be read within that period.

WASHING PROCEDURE

Remove the liquid from the wells by aspiration or inversion. The wells are washed with 350 ul diluted Wash Buffer. When filling the wells make sure not to spill. The wash solution should be in contact with the wells for 30 to 60 seconds. Make sure no residual liquid remains after the final washing step. Perform double aspiration to remove excess buffer. If after such procedure, it still persists, invert the plate onto absorbent paper and tap it several times. Otherwise, erroneous results may be obtained.

Note: the washing procedure is crucial for the test result. If excess wash buffer remains in the wells, or if the wells are not completely filled, erroneous results may be obtained. Do not let the wells air dry during the procedure. Automatic washers should be rinsed with distilled or deionized water at the end of the day to avoid obstructions due to the presence of salt in the wash buffer.

SUMMARY OF THE PROCEDURE

STAGE	PROCEDURE	WARNINGS/OBSERVATIONS
Dilution	Prepare Wash solution (1x)	Dissolve salt crystals
Sample Diluent	Add 50 ul Sample Diluent in each well	
Samples	Add 50 ul S, PC and NC	Color change is observed when adding the sample and controls
Incubation	Cover the wells and incubate for 30 ± 2 minutes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$	In incubator
Washing Step	Wash each well with 350 ul diluted Wash Buffer (5 times)	Time of contact of the Wash solution from 30 to 60 seconds. Completely remove the residual liquid from the wells
Conjugate	Add 100 ul Conjugate	
Incubation	Cover the wells and incubate for 30 ± 2 minutes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$	In incubator
Washing Step	The same as above	
Dilution	Prepare Substrate (1x)	During incubation with the conjugate, dilute TMB100x with TMB diluent
Substrate	Add 100 ul Substrate	Discard the remaining reagent. Avoid contact with oxidizing agents. Do not expose to light.
Incubation	30 ± 2 minutes at $18-25^\circ\text{C}$	Maintain the wells protected from light
Stop	Add 100 ul Stopper	
Reading	Read in spectrophotometer	Read within 10 minutes

ASSAY VALIDATION CRITERIA

The assay is considered valid if the following conditions are simultaneously met:

1- The mean absorbance of the Negative Controls should be less than or equal to 0.150

Example:

Reading 1 = 0.060 Reading 2 = 0.055. Reading 3 = 0.070

Mean = $(0.060 + 0.055 + 0.070)/3 = 0.055$

2- Remove any Negative Control with absorbance greater than 0.150

3- If any Negative Control has been removed recalculate the Negative Control mean. Any assay is valid when at least two of the Negative Controls are accepted.

4- The absorbance mean of the Positive Controls should be greater than 0.900.

Example:

Reading 1 = 1.358. Reading 2 = 1.214

Mean = $(1.358 + 1.214)/2 = 1.286$

5- The absorbance mean difference of the Positive and Negative Controls should be greater or equal to 0.750.

In case one of the above conditions is not met, repeat the assay.

Remember that the obtained readings will depend on the sensitivity of the instrument used.

INTERPRETATION OF RESULTS

The presence or absence of antibodies anti-HTLV I and/or II is determined associating the sample absorbance with the Cut-off value.

Cut-off = NC + 0.200

NC: absorbance mean of the Negative Control

Example: $0.035 + 0.200 = 0.235$

Non-reactive samples: those with absorbance lower than the Cut-off value.

Reactive samples: those with absorbance greater or equal to the Cut-off value.

All samples initially reactive should be repeated by duplicate. If one or both replicates are reactive, it should be considered reactive.

A sample initially reactive may be non-reactive in both replicates. This may be due to:

- Cross contamination of a non-reactive well with a reactive sample.
- Sample contamination during dispensation, lack of precision in sample, conjugate and/or Substrate dispensation into the well.
- Tip re-utilization.
- Well contamination with hypochlorite or other oxidizing agents.

In certain cases a non-reactive sample may produce a falsely

reactive reaction, both in the initial analysis as in its replicates. Some probable causes of this effect may be:

- Sample contamination during collection, processing or storage.
- Presence of interfering substances, such as autoantibodies, drugs, etc.
- Ineffective dispensation and/or aspiration of the wash solution (obstructed system).

PROCEDURE LIMITATIONS

See Known interfering substances under SAMPLE.

Do not use pooled samples.

Do not use other body fluids such as saliva, cerebrospinal fluid or urine.

Repeatedly reactive samples should be tested using supplemental or confirmatory techniques, according to local regulations.

SPECIFIC PERFORMANCE FEATURES

a) Sensitivity

Sensitivity in performance panels

In a study performed on different international commercial panels, the following results were obtained:

PRP205 (M) (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel Modified, BBI, USA) 18 out of 18 reactive samples were detected.

PRP206 (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel, Panel, BBI, USA) 14 out of 14 reactive samples were detected.

PRP207 (Anti-HTLV I/II Mixed Titer Performance Panel, BBI, USA) 14 out of 14 reactive samples were detected.

QRP 712 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE. USA) 5 out of 5 reactive samples were detected.

QRP 751 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE. USA) 4 out of 4 reactive samples were detected.

QRP 761 (Anti-HTLV I/II Qualification Panel, SERACARE. USA) 5 out of 5 reactive samples were detected.

Clinical sensitivity in anti-HTLV I and/or II reactive sample panels

In a study performed on 47 samples with HTLV I and/or II infection, confirmed by different methods, all of the samples were found reactive with the HTLV I+II ELISA recombinante v.4.0 kit.

b) Specificity

In a study performed on 921 sera samples from different health centers of Rosario city, the obtained specificity was 99.67%.

In a further study performed on 1048 plasma samples from different health centers of Rosario city, the obtained specificity was 100%.

A possible cross-reactivity was evaluated. Assaying 184 samples from individuals with different clinical conditions that may be the cause of unspecific reactions for the **HTLV I+II ELISA recombinante v.4.0** test. This group included samples:

- With antibodies to HAV, HBV, EBV, CMV, HSV, VZV, HIV, Chagas and other viruses.

- With different autoantibodies (AGA, AMA, ATA, FAN, Rheumatoid factor and others).
 - With antibodies to *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Trypanosoma cruzi* and other microorganisms.
 - From hemodialyzed patients and pregnant women.
- The obtained specificity for this population was 100%.

c) Precision

The test precision was evaluated following EP15-A protocol recommended by the NCCLS. The assays were performed with samples having different HTLV I & II reactivity levels and with controls. Two daily assays were performed testing each sample by duplicate during 5 days.

	Mean	Intra-assay		Total	
	PI (OD/CO)	S	CV	S	CV
Sample 1	1.25	0.071	5.72%	0.094	7.57%
Sample 2	1.54	0.083	5.42%	0.090	5.86%
Sample 3	3.38	0.149	4.41%	0.177	5.25%
Sample 4	5.21	0.177	3.39%	0.239	4.58%
Sample 5	2.80	0.076	2.72%	0.127	4.53%
Sample 6	1.39	0.056	4.03%	0.092	6.62%
Positive Control	9.32	0.352	3.77%	0.460	4.94%
Negative Control	0.10	0.010	9.64%	0.017	17.05%

n= 20

WIENER LAB. PROVIDES

Kit for 96 tests (Cat. Nr. 1671096)
Kit for 192 tests (Cat. Nr. 1681192)

REFERENCES

- Feuer G. Green PL. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24(39):5996-6004 (2005).
- Roucoux DF. Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* 3:144-54. (2004).
- Poesz BJ. Poesz MJ. Choi D. The human T-cell lymphoma/leukemia viruses. *Cancer Invest* 2 :253-77. (2003).
- Gotuzzo E. Arango C, de Queiroz-Campos A. Istúriz RE. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North Am.* 14(1):21 1-39, x-xi (2000).
- User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy – Approved Guideline EP15-A (2001).
- Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline I/LA21-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline EP7-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Richard Malan. Carolina A. Berini. Seroprevalencia de HTLV-1/2 en donantes de sangre de la provincia de Misiones. *Medicina* (Buenos Aires) 2009; 69: 71-74.
- Nadia C. Santos Quispe. Edwin Bengoa Fera. Elizabeth de los Santos-Fortuna and Adele Caterino-de-Araujo. Con-

- firming the presence of HTLV-1 infection and the absence of HTLV-2 in blood donors from Arequipa. *Perú. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 51(1):25-29. 2009.
- Anna Abrams. Yoshimi Akahata and Steven Jacobson. The Prevalence and Significance of HTLV-I/II Seroindeterminate Western Blot Patterns. *Viruses* 2011. 3. 1320-1331.

SYMBOLS EXPLANATION

Policubeta **Sensib.**

Coated microtitration plate

Conjugado

Conjugate

TMB

TMB

Control **+**

Positive Control

Stopper

Stopper

Diluyente **Muestra**

Sample Diluent

TMB **Diluy.**

TMB Diluent

Buf. Lavado **Conc.**

Concentrated Wash Buffer

Control **-**

Negative Control

SÍMBOLOS // SÍMBOLOS // SYMBOLS

Símbolos que podrían encontrarse en los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab. // Símbolos que podem ser encontrados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab. // Symbols that might be found on Wiener lab diagnostic reagent kits.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro" // Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro" // This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices



Representante autorizado en la Comunidad Europea // Representante autorizado na Comunidade Europeia // Authorized representative in the European Community



Uso diagnóstico "in vitro" // Uso médico-diagnóstico "in vitro" // "In vitro" diagnostic medical device



Contenido suficiente para <n> ensayos // Conteúdo suficiente para <n> testes // Contains sufficient for <n> tests



Fecha de caducidad // Data de validade // Use by



Límite de temperatura (conservar a) // Limite de temperatura (conservar a) // Temperature limitation (store at)



No congelar // Não congelar // Do not freeze



Riesgo biológico // Risco biológico // Biological risks



Volumen después de la reconstitución // Volume após a reconstituição // Volume after reconstitution



Contenido // Conteúdo // Contents



Número de lote // Número de lote // Batch code



Elaborado por: // Elaborado por: // Manufactured by:



Toxicidad aguda // Toxicidade aguda // Acute toxicity



Corrosivo // Corrosivo // Corrosive



Irritante // Irritante // Irritant



Peligroso para el medio ambiente acuático // Perigoso para o ambiente aquático // Hazardous to the aquatic environment



Peligro por aspiración // Risco de aspiração // Aspiration



Consultar instrucciones de uso // Consultar as instruções de uso // Consult instructions for use



Calibrador // Calibrador // Calibrator



Control // Controle // Control



Control Positivo // Controle Positivo // Positive Control



Control Negativo // Controle Negativo // Negative Control



Número de catálogo // Número de catálogo // Catalog number



 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert. N°: 8059/14



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina