

Anti-HTLV I & II Elisa

Sólo para uso profesional In-Vitro

Conservar a 2-8°C

USO

Microplato basado en ELISA para la detección cualitativa de Anti-HTLV I & II (anticuerpo para el virus linfotrópico T humano de tipo I y II) en suero humano o plasma.

INTRODUCCION

Se presume que el HTLV-I y II (virus linfotrópico T humano de tipo I y II) se deriva del virus linfotrópico T de primates con las que comparten una secuencia homológica significativa de nucleótidos. La expresión HTLV fue evaluada usando IFA y HTLV-I & II PCR¹. HAM (HTLV-I-mielopatía asociada) es una paraparesia espástica lentamente progresiva causada por una infección con HTLV-I (virus T-linfotrópico humano tipo I)².

El HTLV se ha asociado causalmente con células T-leucemia adulta y leucemia HTLV-mielopatía asociada. El HTLV-II ha sido incluso asociado con HTLV-mielopatía asociada, pero no con leucemia.

El HTLV-I/II EIA repite tasa reactiva en donantes de sangre al azar de cuatro Centros de transfusión sanguínea establecidas en zonas en Ruanda, con un esperado confirmado anti-VIH I seroprevalencia en donates de sangre de +/-4% --rango de 0 a 0.5%³. Los HTLV-I/II (virus T-linfotrópico humano tipo I y II) están estrechamente relacionadas pero con retrovirus distintos que pueden afectar humanos⁴. Una posible asociación entre la infección HTLV-VII y HIV 1 podrían examinarse después de una prueba confirmatoria de HTLV-VII EIA repetitiva reactiva.

PRINCIPIO DE MEDICION

Este ensayo está basado sobre el método sandwich de un paso. Muestras, pocillos recubiertos de recombinantes HTLVs y enzima recombinante identificada HTLVs son combinadas. Durante la incubación, Anti-HTLVs presente en las muestras se permiten a reaccionar simultáneamente con los dos antígenos, resultando en el Anti-HTLV siendo intercalado entre la fase sólida y antígeno ligado de enzimas. Después de lavado, un complejo es generado entre la fase sólida, el Anti-HTLV dentro de la muestra y antígeno ligado de enzimas por reacción inmunológica. Sustrato concentrado y sustrato diluido son entonces añadidos y catalizados por este complejo. La reacción cromogénica resultante es medida como absorbancia. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de Anti-HTLV.

COMPONENTES

1. Pocillos Recubiertos

Un plato de 96 pocillos recubiertos con HTLV recombinado.

2. Enzima Conjugada

Un vial conteniendo 6ml de peroxidasa de rábano recombinada HTLVs en un buffer conteniendo proteínas de origen bovino. Contiene 0.1% preservativo ProClin 300.

3. Control Negativo

Un vial conteniendo 1 ml de suero humano normal. El suero es diluido en un bufer conteniendo proteínas de origen bovino. Contiene 0.1% preservativo ProClin 300.

4. Control Positivo

Un vial conteniendo 1 ml de suero humano inactivado. El Anti-HTLV diluido en un bufer conteniendo proteínas de origen bovino. Contiene 0.1% preservativo ProClin 300.

5. Solución Stop

Un vial conteniendo 11 ml de 1 mol/l ácido sulfúrico.

6. Sustrato concentrado

Un vial conteniendo 7.5 ml de TMB (3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina y estabilizadores en una solución.

7. Sustrato diluyente

Un vial conteniendo 7.5 ml de citrato de tri-sodio y peróxido de hidrógeno.

8. Solución de lavado concentrada

Un vial conteniendo 50 ml de 20 tiempos PBS-Tween bufer de lavado.

9. Un inserto con las instrucciones.

10. Dos piezas de tapa de plato.

11. Una bolsa zip-lock.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Papel absorbente y papel toalla
2. Canales reactivos desechables
3. Agua destilada
4. Incubador
5. Micropipetas y micropipetas multicanal de volúmenes apropiados.
6. Agitador magnético
7. Agitador de placas
8. Instrumentación
 - 1) Lavador automático de microplatos.
 - 2) Lector de microplato.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Sólo para uso profesional
2. Siga cuidadosamente las instrucciones. No se garantiza La seguridad de los resultados del ensayo si ha existido alguna desviación de las instrucciones indicadas en este inserto.
3. Consulte la hoja de datos y el etiquetado de productos para cualquier peligro químico que puede estar presente en este ensayo.
4. PRECAUCION: Este ensayo contiene materiales de origen animal. Componentes bovinos originados de ciudades donde BSE no ha sido reportado. Se recomienda que todos los materiales de origen humano sean considerados potencialmente infecciosos.
5. Maneje cuidadosamente los materiales potencialmente contaminados de acuerdo con los requisitos locales.
6. Utilice guantes desechables mientras trate con las muestras y reactivos. Lave sus manos al finalizar el ensayo.
7. Mantenga el ensayo fuera de malas condiciones ambientales. Por ejemplo, un ambiente con una alta concentración de gas corrosivo en el aire, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, y así sucesivamente ó conteniendo polvo.
8. Mezcle la muestra en el fondo de los pocillos por sacudida y elimine las burbujas.
9. Lave los pocillos completamente. Cada pocillo debe estar totalmente inyectado con solución de lavado. La fuerza de inyección, sin embargo, no supone que sea demasiado intensa para evitar que se desborde. En cada lavado circular, seque los en cada pocillo. Golpee la placa de microtitulación sobre papel absorbente para remover los residuos de agua. Es recomendable lavar la placa de microtitulación con un lavador automático.
10. Los tips de micropipetas no deben intercambiarse para evitar contaminación cruzada.
11. No utilice los reactivos después de la fecha de expiración indicada en la etiqueta.
12. No mezcle o utilice componentes de kits con diferentes lotes.
13. Es recomendable que no se utilicen más de 32 pocillos por cada corrida de ensayo, si se utiliza una pipeta manual, el pipeteo de las muestras y controles deben ser completado dentro de 5 minutos.

Utilice un plato completo de 96 pocillos si está disponible una pipeta automática.

14. Realice todos los pasos del procedimiento cuidadosamente para obtener resultados seguros. Observe el tiempo de incubación cuando agregue sustrato concentrado y la solución de stop. No exceda de 3-4 minutos para cada operación; agregue el reactivo en la misma frecuencia.

15. Deseche la solución de sustrato concentrado si esta luce azul antes de utilizarla. Cualquier cambio de color no específico puede ocurrir por contaminación del reactivo durante su uso.

16. Ninguna prueba disponible en el mercado es capaz de garantizar la absoluta ausencia de los agentes responsables del HIV (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), Hepatitis B ó C. Todos los reactivos y las muestras de origen humano deben considerarse como potencialmente infecciosas, por lo tanto, todos los desechos deben ser eliminados acorde con las reglas de seguridad adecuadas.

17. Incinere el material combustible, materiales de autoclave no-combustible por lo menos por 1 hora a 121°C.

18. Los residuos líquidos (caja conteniendo ácido) deben ser neutralizados y tratados con hipoclorito a una concentración final de 2.5%. Dejar accionar el hipoclorito por lo menos por 30 minutos. Para neutralizar desechos ácidos, agregue una cantidad suficiente de hidroxido de sodio antes del tratamiento con hipoclorito.

ALMACENAMIENTO

1. Conserve todos los componentes a 2-8°C. No congele. Evite fuerte iluminación.

2. Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa zip-lock proporcionada y retorne a 2-8°C, bajo condiciones en que los pocillos puedan mantenerse estable por 2 meses, ó hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

3. Selle y retorne todos los reactivos no utilizados a 2-8°C, bajo condiciones en que los pocillos puedan mantenerse estable por 2 meses, ó hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

MUESTRAS

1. Colecte suero o plasma de acuerdo con las correctas prácticas médicas.

2. Evite emolítica engrosada, icterica o muestras turbias.

3. Conserve las muestras a temperatura ambiente hasta 1-5 días a 2-8°C, conserve a -20°C para largos períodos de tiempo. Evite múltiples ciclos de Congelar-descongelar. Después de descongelar, coloque a temperatura ambiente y mezcle bien por sacudida.

4. Evite agregar preservativos a las muestras, principalmente azida sódica, la cual inhibe la reacción de la enzima.

PREPARACION DEL REACTIVO

1. Agregue 1 volumen de fluido de lavado concentrado a 19 volúmenes de agua destilada para dar el volumen requerido, y mezcle bien con un agitador magnético. El fluido de lavado es estable por un mes si se conserva a 2-8°C.

2. Mezcle un volumen de sustrato concentrado con un volumen de sustrato diluido en un contenedor limpio. Evite luz directa. Utilice esta mezcla dentro de una hora desde el momento de la preparación. Prepare la cantidad necesaria para la prueba.

PROCEDIMIENTO DE MEDICION

1. Utilice solo el número de pocillos requeridos para la prueba.

2. Agregue 50 ul de muestras o controles a los pocillos. Deje el pocillo A1 como el pocillo en blanco. Para cada plato agregue 50ul del control negativo a pocillos B1 y C1 y 50ul de control positivo a pocillos D1 y E1. Agregue los controles a los pocillos designados después de dispensadas las muestras.

3. Agregue 50ul de enzima conjugada a cada pocillo, excepto el pocillo en blanco.

4. Cubra el plato con una tapa e incube a 37°C por 60 minutos.

5. Lave el plato 5 veces con 300 ul de fluido de lavado diluido. Después de completado el lavado, invierta la placa y golpee ligeramente hacia fuera cualquier residuo del fluido de lavado sobre papel absorbente.

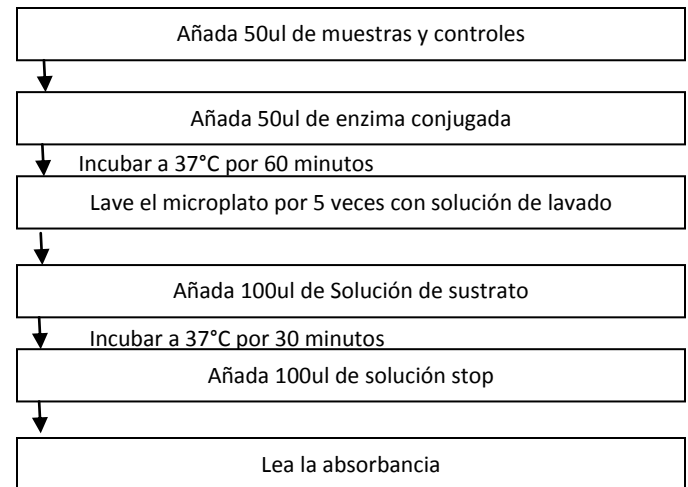
6. Agregue 100ul del sustrato mixto en cada pocillo, incluyendo el pocillo en blanco.

7. Cubra el plato con una tapa e incube a 37°C por 30 minutos. Preteja de la luz directa.

8. Agregue 100 ul de solución de stop en cada pocillo, incluyendo el blanco.

9. Dentro de 15 minutos leer la absorbancia de cada pocillo al 450 nm.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO



MEDICION DE LOS RESULTADOS

Cada plato debe ser considerado separadamente cuando se calculan e interpretan los resultados del ensayo.

1. Control Negativo

Calcule la absorbancia media de las réplicas del control negativo.

2. Valor de corte

Calcular el valor de corte mediante la adición de 0,18 y la media de la las réplicas del Control Negativo.

3. Ejemplo

Absorbancia Control Negativo: pocillo 1=0.032, pocillo 2=0.028

Media control negativo: $= (0.032 + 0.028) / 2 = 0.03$

Valor de corte: $= 0.03 + 0.18 = 0.21$

CONTROL DE PROCEDIMIENTOS

El requisito de control recomendado para este ensayo es utilizando controles positivos y negativos para comprobar el rendimiento del ensayo. El resultado es válido si lossiguientes criterios para los controles se cumplen:

1. Blanco:

El A_{blanco} es menor que 0.08.

2. Control Negativo

La A_{450} de cada control negativo no es más de 0.01.

3. Control Positivo

La A_{450} de cada control positivo es más de 1.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

1. Resultados no reactivos

Las muestras que den una absorbancia menor que el valor de corte se consideran no reactivas.

2. Resultados reactivos

Las muestras que den una absorbancia igual o mayor que 1.1 tiempos del valor de corte se consideran inicialmente reactivas en el ensayo. Estas muestras deben ser reexaminadas por Western Blot o PCR para confirmar los resultados.

3. Resultados indeterminados

Para las muestras que den una absorbancia en la media, el ensayo se considera indeterminado. Todos los pacientes con resultados indeterminados deben ser reexaminados y debe tomarse una nueva muestra.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Este ensayo ha sido diseñado como una ayuda para el diagnóstico clínico. Llevar a cabo este ensayo junto con la historia clínica examen clínico del paciente, y los resultados de otras pruebas

2. Anticuerpos heterófilos y de factor reumatoide en las muestras pueden interferir con los resultados de la prueba. Este tipo de muestras no es adecuado para ser probado mediante este ensayo.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1. Medición de Precisión

Este ensayo fue diseñado para tener una precisión interserial de <10%. Fue ensayado un suero bovino basado en miembro panel, utilizando 1 lote de reactivos, en replicas de 10. Los datos de este estudio se resumen en la siguiente tabla:

Panel	Lote	N	Media	Repetibilidad de la medición	
Miembro				SD	%CV
1	1	10	1.41	0.096	6.8

2. Sensibilidad

La sensibilidad de diagnóstico del producto se determinó probando un panel de 460 muestras positivas. Todas las muestras resultaron positivas, por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica fue del 100%.

Muestras	Muestras Probadas	Muestras positivas
Anti-HTLV I Positivo	460	460
Anti-HTLV II Positivo	200	200

3. Especificidad

La especificidad diagnóstica se determinó analizando un panel de 1260 muestras negativas, en paralelo con las pruebas disponibles en el mercado. Los resultados obtenidos muestran una especificidad de diagnóstico de 99.8%.

		Este ensayo		
		Positivo	Negativo	Total
Prueba de referencia	Positiva	46	0	46
	Negativa	3	1257	1260
	Total	49	1257	1306

LITERATURAS DE REFERENCIA

1. Slattery JP, Franchini G, Gessain A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res.* 1999(6):525-540.

2. Murphy EL, Frider J, Srnith JW, et al. HTLV-associated myofopathy in a cohort of HTLVJ and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. *Neurology.* 1997;a8(2):31 5-320.

3. Anon. Guidelines for counseling persons infected with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-D and type II (HfLV-II). Centers for Disease Control and Prevention and the U.S.P.H.S. Working Group. *Ann. Intern. Med.* 1993; 118(6):448-454.