

BIOLISA HTLV I/II DBS

REF **K257**

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste imunoenzimático (ELISA) para determinação qualitativa de anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) para os vírus de HTLV I e HTLV II em amostras de sangue seco coletadas em papel filtro (DBS). Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

**Metodologia:** Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático  
O kit BIOLISA HTLV I/II DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio sanduíche de detecção qualitativa de Anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) para HTLV I/II em amostras humanas de sangue seco coletadas em papel filtro. Anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) presentes na amostra de sangue seco são eluídas e se ligam aos antígenos recombinantes de HTLV I/II revestidos na microplaca formando imunocomplexos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Antígenos recombinantes conjugados à Peroxidase são adicionados à microplaca que é então incubada. Os antígenos recombinantes conjugados a enzima ligam-se aos Anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) Anti- HTLV I/II presentes, ligados à placa revestida com antígeno. Nova lavagem é realizada para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul que indica a quantidade de Anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) Anti- HTLV I/II presentes na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação havendo uma mudança de cor de azul para amarelo. A intensidade da cor é medida em 450/620 nm.

REAGENTES

**1- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Placa Sensibilizada com antígeno recombinante de HTLV I/II e conservante.  
**2- Conjugado** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão contendo antígenos recombinantes de HTLV I/II ligados à peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.  
**3- Lavagem Concentrada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.  
**4- Substrato** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Uréia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.  
**5- Solução de Parada** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Ácido Clorídrico 1 M.  
**6- Tampão de Eluição** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.  
**7- Controle Negativo DBS** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra não reativa para anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) Anti-HTLV I/II impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**  
**8- Controle Positivo DBS** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Amostra reativa para anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) Anti - HTLV I/II impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

APRESENTAÇÃO

| REAGENTES                       | 1                | 2                 | 3                 |
|---------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|                                 | 96 cavidades     | 192 cavidades     | 480 cavidades     |
| <b>1- Placa Sensibilizada</b>   | 1 Unidade        | 2 Unidades        | 5 Unidades        |
| <b>2- Conjugado</b>             | 1 Frasco x 12 mL | 1 Frascos x 24 mL | 1 Frasco x 60 mL  |
| <b>3- Lavagem Concentrada</b>   | 1 Frasco x 50 mL | 1 Frasco x 100 mL | 1 Frasco x 250 mL |
| <b>4- Substrato</b>             | 1 Frasco x 12 mL | 1 Frasco x 24 mL  | 1 Frasco x 60 mL  |
| <b>5- Solução de Parada</b>     | 1 Frasco x 12 mL | 1 Frasco x 24 mL  | 1 Frasco x 60 mL  |
| <b>6-Tampão de Eluição</b>      | 1 Frasco x 24 mL | 1 Frasco x 48 mL  | 1 Frasco x 120 mL |
| <b>7- Controle Negativo DBS</b> | 1 Unidade        | 2 Unidades        | 3 Unidades        |
| <b>8- Controle Positivo DBS</b> | 1 Unidade        | 2 Unidades        | 3 Unidades        |

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

- Reagentes descritos no quadro anterior

Materiais necessários não contidos no kit:

**1-** Pipetas capazes de dispensar volumes de 50 a 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.  
**2-** Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).  
**3-** Lavadora de microplaca (opcional).  
**4-** Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 620 nm de comprimento de onda.  
**5-** Papel absorvente para secar as microcavidades.  
**6-** Cronômetro ou relógio.  
**7-** Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluição.  
**8-** Água destilada ou deionizada.  
**9-** Ferramentas de Controle de Qualidade.  
**10-** Incubadora 37 °C ± 2 °C.  
**11-** Picotador de papel (diâmetro de 3 + 0,2 mm).

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C. O transporte em temperaturas até 30 °C não deverá exceder 5 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

**1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**  
**2-** Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.  
**3-** O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8 °C.  
**4-** A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.  
**5-** Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.  
**6-** A Solução de Parada contém Ácido Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.  
**7-** Toda matéria-prima do produto é testada sendo não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém amostra biológica é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.

**8-** Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.  
**9-** Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.  
**10-** Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.  
**11-** Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.  
**12-** Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.  
**13-** Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha de Dados de Segurança) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.  
**14-** Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.  
**15-** É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Sangue Seco coletado em papel filtro (DBS) – EDTA ou Punção

O papel filtro utilizado deve ser específico para coleta de amostras de sangue seco, a exemplo dos modelos S&S 903 e Ahlstrom 226. O laboratório deve certificar da qualidade das amostras antes da sua utilização. As amostras de sangue seco em papel de filtro podem ser armazenadas à temperatura ambiente desde que fiquem protegidas de fonte de luz solar direta e em baixa umidade. Para armazenamento de até 2 anos, as amostras devem permanecer sob refrigeração, entre 2 e 8 °C. O armazenamento por tempo superior a 2 anos, deve ser realizado a temperatura de -20 °C.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA HTLV I/II DBS é estável após aberto até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco Nº 3 (Lavagem Concentrada) na proporção 1:20 de água destilada ou deionizada; por exemplo: 50 mL de solução de Lavagem Concentrada em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 °C por até 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

Todos os demais reagentes são prontos para uso.

TÉCNICA

Para uso em equipamentos automáticos, consulte ao SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente).

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, Controles e Amostras para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30°C) por, no mínimo, 40 minutos.

**1-** Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel de filtro (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.  
**2-** Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).  
**3-** Adicionar um disco de 3mm de Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel filtro, previamente picotados, nas cavidades determinadas.  
**4-** Pipetar 200 µL do Tampão de Eluição em todas as cavidades.  
**5-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos, cobrir as cavidades com selador de placas.  
**6-** Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.  
**7-** Retirar o selador das cavidades.

**8-** Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora para técnica de papel filtro). Usar 500 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada**, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem e molho de 30 segundos para cada ciclo. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

**Nota:** Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

**9-** Pipetar 100 µL de Conjugado em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.  
**10-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.  
**11-** Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.  
**12-** Retirar o selador de placa das cavidades.  
**13-** Repetir o item 8.  
**14-** Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades.  
**15-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.  
**16-** Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.  
**17-** Retirar o selador de placa das cavidades.  
**18-** Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.  
**19-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.  
**20-** Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 620 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco e dos Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

| ITEM                         | ABSORBÂNCIAS |
|------------------------------|--------------|
| <b>Branco</b>                | < 0,300      |
| <b>Controle Negativo DBS</b> | < 0,300      |
| <b>Controle Positivo DBS</b> | > 1,000      |

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

CÁLCULOS QUALITATIVO

Calcular Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo DBS + 0,200.

Exemplo:

| ITEM                                                                | ABSORBÂNCIAS                         |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Controle Negativo DBS</b>                                        | 0,102                                |
|                                                                     | 0,104                                |
| <b>Cut Off = Absorbância média do Controle Negativo DBS + 0,200</b> | [(0,102 + 0,104) /2] + 0,200 = 0,303 |

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut Off. Exemplo:

| ITEM                                       | ABSORBÂNCIAS         |
|--------------------------------------------|----------------------|
| <b>Amostra</b>                             | 0,953                |
| <b>Valor de Cut Off</b>                    | 0,303                |
| <b>Índice = Amostra / Valor de Cut Off</b> | 0,953 / 0,303 = 3,14 |

**Nota:** Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados. Cada laboratório deverá validar o cut-off conforme instrumentação utilizada e população pesquisada.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o cálculo do Índice das amostras, considerar os índices abaixo para determinação dos resultados.

| RESULTADOS              | QUALITATIVO |
|-------------------------|-------------|
|                         | ÍNDICE      |
| Negativo (Não Reagente) | ≤ 0,8       |
| Indeterminado           | 0,8 e 1,2   |
| Positivo (Reagente)     | ≥ 1,2       |

Amostras com índice superior ou igual a 1,2 são consideradas como positivas, amostras com índice inferiores ou igual a 0,8 são consideradas como negativas e amostras que apresentam índice entre 0,8 e 1,2 são consideradas indeterminadas. Dessa forma, temos que a amostra citada no exemplo, cuja absorbância foi 0,953 e índice de 3,77, apresenta resultado positivo (índice ≥ 1,2).

**Observação:** No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnostico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação, antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo da doença.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada para as concentrações de Triglicérides 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Foi realizado um estudo com 95 amostras negativas para HTLV I/II, mas positivas para outras infecções. Dentre elas 15 amostras positivas para Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), 10 amostras positivas para HbsAg, 10 amostras positivas para Sífilis, 10 amostras positivas para Hepatite C (HCV), 10 amostras positivas para Doença de Chagas,10 amostras positivas para Zika, 10 amostras positivas para Citomegalovírus (CMV), 10 amostras positivas para Rubéola, 10 amostras positivas para Toxoplasmose. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnóstico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

DESEMPENHO DO PRODUTO

PRECISÃO

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

| Repetibilidade               | AMOSTRA |        |         |
|------------------------------|---------|--------|---------|
|                              | 1       | 2      | 3       |
| Média                        | 0,4680  | 1,6336 | 0,1242  |
| Desvio Padrão                | 0,0425  | 0,0553 | 0,0131  |
| Coefficiente de Variação (%) | 9,0889  | 3,3824 | 10,5328 |

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

| Reprodutibilidade            | AMOSTRA |        |        |
|------------------------------|---------|--------|--------|
|                              | 1       | 2      | 3      |
| Média                        | 0,4653  | 1,6090 | 0,1210 |
| Desvio Padrão                | 0,0307  | 0,0570 | 0,0073 |
| Coefficiente de Variação (%) | 6,6015  | 3,5453 | 6,0205 |

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit BIOLISA HTLV I/II DBS foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzimaímunoensaio de referência. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA HTLV I/II DBS é de 96,0% e a especificidade clínica é de 98,73%.

|                          |          | Resultado Referência |          |       |
|--------------------------|----------|----------------------|----------|-------|
|                          |          | Positivo             | Negativo | Total |
| BIOLISA<br>HTLV I/II DBS | Positivo | 48                   | 2        | 50    |
|                          | Negativo | 1                    | 78       | 79    |
|                          | Total    | 49                   | 80       | 129   |

Sensibilidade Clínica: 96,0% (48/50) (IC 95% = 86,3 – 99,5%)

Especificidade Clínica: 98,73% (78/79) (IC 95% = 93,1 – 100%)

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

O Vírus Linfotrópico de Células T humanas (HTLV) é um membro da família Retroviridae e se classifica em dois tipos: HTLV-1 e HTLV-2. Estes retrovírus infectam células T humana que são importantes para o sistema de defesa do organismo. Sendo que, o HTLV-1 com preferência por células CD4+ e o HTLV-2 por células CD8, ambos com a capacidade de se integrar no genoma da célula hospedeira passando a se chamar de provírus. Sua transmissão pode ser tanto vertical quanto horizontal através do ato sexual, pelo leite materno, transfusão de sangue e/ou uso de drogas intravenosas. As principais patologias causadas por esses vírus são leucemia de células T do adulto (LLcTA), Uveíte, além de outras manifestações como dermatite infecciosa.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
- 2- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 3- Lopes B, Rezende P, Pereira L e Lemos J. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical39(6):548-552, nov-dez, 2006.
- 4- Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1
- 5- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
- 6- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.



**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**  
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail:bioclin@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente  
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do kit BIOLISA HTLV I/II DBS na ANVISA: 10269360448

**Revisão:** Março/2024

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

|  |                                           |  |                                                      |
|--|-------------------------------------------|--|------------------------------------------------------|
|  | NÚMERO DE CATÁLOGO                        |  | FABRICADO POR                                        |
|  | NÚMERO DO LOTE                            |  | CONTROLE                                             |
|  | DATA DE FABRICAÇÃO                        |  | CONTROLE POSITIVO                                    |
|  | DATA DE VALIDADE<br>(último dia do mês)   |  | CONTROLE NEGATIVO                                    |
|  | LIMITE DE TEMPERATURA<br>(conservar a)    |  | RISCO BIOLÓGICO                                      |
|  | O CONTEÚDO É SUFICIENTE<br>PARA <N> TESTE |  | INFLÂMAVEL                                           |
|  | CONSULTAR INSTRUÇÕES<br>DE USO            |  | CORROSIVO                                            |
|  | PRODUTO PARA<br>DIAGNÓSTICO IN VITRO      |  | TÓXICO                                               |
|  | PROTEGER DA<br>LUZ E CALOR                |  | NÃO UTILIZAR SE A<br>EMBALAGEM ESTIVER<br>DANIFICADA |
|  | NÃO REUTILIZE                             |  | PRODUTO<br>ESTERELIZADO                              |
|  | CUIDADO                                   |  | PERIGO                                               |

BIOLISA HTLV I/II DBS

REF **K257**

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) contra los virus HTLV I y HTLV II en muestras de sangre seca recogidas en papel de filtro (DBS). Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

**Metodología:** Inmunoensayo enzimático o inmunoensayo enzimático. El kit BIOLISA HTLV I/II DBS es un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el principio sándwich de detección cualitativa de anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) contra HTLV I/II en muestras de sangre humana seca recolectadas en papel de filtro. Los anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) presentes en la muestra de sangre seca se eluyen y se unen a los antígenos HTLV I/II recombinantes recubiertos en la microplaca, formando complejos inmunes. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Se añaden antígenos recombinantes conjugados con peroxidasa a la microplaca, que luego se incuban. Los antígenos recombinantes conjugados con enzimas se unen a los anticuerpos totales Anti-HTLV I/II (IgG, IgA e IgM) presentes, unidos a la placa recubierta de antígeno. Se realiza un nuevo lavado para eliminar el exceso. Luego de este paso, se agrega el Sustrato y se incuban, produciendo un color azul que indica la cantidad de Anticuerpos Anti-HTLV I/II totales (IgG, IgA e IgM) presentes en la muestra. Se agrega la solución de parada para detener la reacción y se produce un cambio de color de azul a amarillo. La intensidad del color se mide a 450/620 nm.

REACTIVOS

- 1- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Placa Sensibilizada con antígeno HTLV I/II recombinante y conservante.
- 2- Conjugado** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón que contiene antígenos HTLV I/II recombinantes unidos a peroxidasa, tensioactivo, estabilizadores, colorante y conservante.
- 3- Lavado Concentrado** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: solución tampón (fosfato < 0,5 mol/l, cloruro de potasio < 100 mmol/l, cloruro de sodio < 5 mol/l), tensioactivo y conservante.
- 4- Sustrato** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución tampón que contiene peróxido de urea, tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
- 5- Solución de parada** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Ácido Clorhídrico 1 M.
- 6- Tampón de Elución** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución tampón, tensioactivo, estabilizador y conservante.
- 7- Control negativo DBS** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Muestra no reactiva para anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) Anti-HTLV I/II impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Control positivo DBS** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Muestra reactiva para anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) Anti - HTLV I/II impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**

PRESENTACIÓN

| REACTIVOS               | 1              | 2               | 3               |
|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                         | 96 cavidades   | 192 cavidades   | 480 cavidades   |
| 1- Placa Sensibilizada  | 1 Unidad       | 2 Unidades      | 5 Unidades      |
| 2- Conjugado            | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 3- Lavado Concentrada   | 1 Vial x 50 mL | 1 Vial x 100 mL | 1 Vial x 250 mL |
| 4- Sustrato             | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 5- Solución de Parada   | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 6- Tampón de Elución    | 1 Vial x 24 mL | 1 Vial x 48 mL  | 1 Vial x 120 mL |
| 7- Control Negativo DBS | 1 Unidad       | 2 Unidades      | 3 Unidades      |
| 8- Control Positivo DBS | 1 Unidad       | 2 Unidades      | 3 Unidades      |

EQUIPOS Y INSUMOS OPERACIONALES

- Reactivos descritos en la tabla anterior

Materiales necesarios no contenidos en el kit:

- 1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 50 a 500 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
- 2- Repipetador para pipetee repetitivo de volúmenes de 500 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplacas (opcional).
- 4- Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 620 nm de longitud de onda.
- 5- Papel absorbente para secar las microcavidades.
- 6- Cronómetro o reloj.
- 7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
- 8- Agua destilada o desionizada.
- 9- Herramientas de Control de Calidad.
- 10- Incubadora 37 °C ± 2 °C.
- 11- Trituradora de papel (diámetro 3 + 0,2 mm).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento debe ser de 2 a 8 °C. El transporte a temperaturas de hasta 30 °C no debe exceder los 5 días. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- Únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.
- 3- El sobre que contiene la microplaca sólo debe abrirse después de alcanzar la temperatura ambiente. Devuelva las tiras de microcavidades no utilizadas al sobre, ciérrelo y guárdelo entre 2 y 8 °C.
- 4- El agua utilizada para limpiar el material debe ser reciente y libre de contaminantes.
- 5- Las columnas desionizantes saturadas liberan agua alcalina, diversos iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.
- 6- La solución de parada contiene ácido clorhídrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manéjelo con el debido cuidado.
- 7- Todas las materias primas del producto se prueban y no son reactivas para HBsAg, Anti-HIV 1&2 y Anti HCV. Sin embargo, estas pruebas no ofrecen total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga una muestra biológica es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tomar las precauciones de bioseguridad adecuadas al manipular estos productos.

- 8- Pipetear siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.
- 9- Como medida de protección, la placa debe estar cubierta durante la reacción.
- 10- Se debe asegurar que el fondo de la cavidad esté limpio y seco y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante la prueba.
- 11- No exponer los reactivos, especialmente el Sustrato, a luz fuerte o vapores de Hipoclorito durante las etapas de almacenamiento o incubación.
- 12- Recomendamos aplicar normas de protección ambiental locales, estatales y federales para que los reactivos y material biológico sean dispuestos de acuerdo con la legislación vigente.
- 13- Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consulte la HDS (Hoja de Datos de Seguridad) disponible en el sitio web [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) o mediante solicitud a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.
- 14- No utilice el producto si el embalaje está dañado.
- 15- Es imprescindible que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Sangre seca recogida en papel de filtro (DBS) – EDTA o Punción

El papel de filtro utilizado debe ser específico para la recolección de muestras de sangre seca, como los modelos S&S 903 y Ahlstrom 226. El laboratorio debe certificar la calidad de las muestras antes de su uso. Las muestras de sangre secadas en papel de filtro se pueden almacenar a temperatura ambiente siempre que estén protegidas de la luz solar directa y en condiciones de baja humedad. Para almacenamiento de hasta 2 años, las muestras deben permanecer refrigeradas, entre 2 y 8 °C. El almacenamiento durante más de 2 años debe realizarse a una temperatura de -20 °C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad después de la apertura

Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit BIOLISA HTLV I/II DBS es estable después de abrirlo por hasta 30 días. Esta estabilidad puede variar según la prueba y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado

Diluir el contenido de la botella N° 3 (Lavado Concentrado) en una proporción 1:20 de agua destilada o desionizada; por ejemplo: 50 mL de solución de Lavado Concentrado en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Después de la preparación, la solución se puede almacenar entre 2 y 30 °C hasta por 30 días. Si se produce cristalización, calentar a 37 °C hasta que se disuelva.

Todos los demás reactivos están listos para usar.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos consultar con SAC (Servicio de Asesoramiento al Cliente).

- Antes de comenzar el ensayo, coloque todos los reactivos, controles y muestras para que se establezcan a temperatura ambiente (15 – 30 °C) durante al menos 40 minutos.
- 1- Separar las cavidades a utilizar considerando: Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recolectadas en papel de filtro (se recomienda realizar la prueba por duplicado). Devuelva las tiras de microplacas no utilizadas al embalaje sellado original.
- 2- Separar la primera cavidad para el Blanco (OPCIONAL).
- 3- Agregue un disco de 3 mm de Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recolectadas en papel de filtro, previamente perforado, en las cavidades determinadas.
- 4- Pipetee 200 µL de tampón de elución en todos los pocillos.
- 5- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir los pocillos con sellador de placas.
- 6- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en incubadora a 37°C ± 2°C.
- 7- Retirar el sellador de las cavidades.

- 8- Desechar el contenido de las cavidades aspirando (Lavadora para técnica de papel de filtro). Utilice aproximadamente 500 µL de solución de lavado, **previamente preparada**, y realice un total de cinco (5) ciclos de lavado y remojo de 30 segundos por cada ciclo. Para asegurar que el plato se seque, al final del lavado, golpee el plato durante unos segundos sobre papel absorbente.
- Nota:** Un lavado/secado deficiente puede provocar resultados inadecuados.
- 9- Pipetee 100 µL de conjugado en todos los pocillos, incluido el pocillo Blanco.
- 10- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra las cavidades con sellador de placas.
- 11- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 12- Retirar el sellador de placas de las cavidades.
- 13- Repetir el punto 8.
- 14- Pipetear 100 µL de sustrato en todos los pocillos.
- 15- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra las cavidades con sellador de placas.
- 16- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 17- Retirar el sellador de placas de las cavidades.
- 18- Pipetee 100 µL de solución de parada en todos los pocillos.
- 19- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.
- 20- Leer usando doble filtro: 450 nm / 620 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN TÉCNICA

Comprobar si los resultados obtenidos en la lectura del Blanco y Controles son compatibles con los valores que se presentan a continuación:

| ITEM                 | ABSORBÂNCIAS |
|----------------------|--------------|
| Blanco               | < 0,300      |
| Control Negativo DBS | < 0,300      |
| Control Positivo DBS | > 1,000      |

Si los valores están fuera de los valores esperados se debe repetir la técnica.

CÁLCULOS

CUALITATIVO

Calcule el Cut Off de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cut Off = Absorbancia media del control negativo DBS + 0,200.

Ejemplo:

| ITEM                                                         | ABSORBÂNCIAS                         |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Control Negativo DBS                                         | 0,102                                |
|                                                              | 0,104                                |
| Cut Off = Absorbancia media del control negativo DBS + 0,200 | [(0,102 + 0,104) /2] + 0,200 = 0,303 |

Calcule el índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off. Ejemplo:

| ITEM                                | ABSORBÂNCIAS         |
|-------------------------------------|----------------------|
| Muestra                             | 0,953                |
| Valor de Cut Off                    | 0,303                |
| Índice = Muestra / Valor de Cut Off | 0,953 / 0,303 = 3,14 |

**Nota:** Los datos presentados en los ejemplos son solo para ilustración y no se pueden utilizar para calcular resultados. Cada laboratorio debe validar el punto de corte según la instrumentación utilizada y la población investigada.

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**  
Después de calcular el índice de muestra, considere los índices siguientes para determinar los resultados.

| RESULTADOS             | CUALITATIVO |
|------------------------|-------------|
|                        | ÍNDICE      |
| Negativo (No Reactivo) | ≤ 0,8       |
| Indeterminado          | 0,8 y 1,2   |
| Positivo (Reactivo)    | ≥ 1,2       |

Las muestras con un índice mayor o igual a 1,2 se consideran positivas, las muestras con un índice menor o igual a 0,8 se consideran negativas y las muestras con un índice entre 0,8 y 1,2 se consideran indeterminadas. Por tanto, la muestra mencionada en el ejemplo, cuya absorbancia fue de 0,953 y índice de 3,77, presenta un resultado positivo (índice ≥ 1,2).

**Nota:** En caso de un resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse. Las muestras que produzcan resultados repetidamente indeterminados se deben volver a analizar utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra dentro de dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recogida. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable y no son el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

**LIMITACIONES DEL PROCESO**  
La interpretación de una prueba diagnóstica no debe establecerse en base a una única prueba. Se deben incluir otras pruebas de confirmación antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible antes del diagnóstico definitivo de la enfermedad.

**INTERFERENCIAS**  
No se observaron interferencias para las concentraciones de Triglicéridos 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albúmina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL. dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Factor Reumatoide 980 UI/mL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL y Antiestreptolisina O 1023 UI/mL.

**REACTIVIDAD CRUZADA**  
Se realizó un estudio con 95 muestras que resultaron negativas para HTLV I/II, pero positivas para otras infecciones. Entre ellas 15 muestras positivas para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), 10 muestras positivas para HBsAg, 10 muestras positivas para Sfilis, 10 muestras positivas para Hepatitis C (VHC), 10 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 10 muestras positivas para Zika, 10 muestras positivo para Citomegalovirus (CMV), 10 muestras positivas para Rubéola, 10 muestras positivas para Toxoplasmosis. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

**CONTROL DE CALIDAD INTERNO**  
El Laboratorio Clínico debe contar con un programa de control de calidad interno, donde estén claramente establecidos los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a variaciones. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presentan una variabilidad analítica característica, la cual debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para ello, se recomienda utilizar controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las dosificaciones.

**RENDIMIENTO DEL PRODUCTO**  
**PRECISIÓN**  
**Repetibilidad**  
La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

| Repetibilidad                 | MUESTRA |        |         |
|-------------------------------|---------|--------|---------|
|                               | 1       | 2      | 3       |
| Promedio                      | 0,4680  | 1,6336 | 0,1242  |
| Desvío Patrón                 | 0,0425  | 0,0553 | 0,0131  |
| Coefficiente de Variación (%) | 9,0889  | 3,3824 | 10,5328 |

**Reproducibilidad**  
La reproducibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

| Reproducibilidad              | MUESTRA |        |        |
|-------------------------------|---------|--------|--------|
|                               | 1       | 2      | 3      |
| Promedio                      | 0,4653  | 1,6090 | 0,1210 |
| Desvío Patrón                 | 0,0307  | 0,0570 | 0,0073 |
| Coefficiente de Variación (%) | 6,6015  | 3,5453 | 6,0205 |

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICAS**  
Se utilizó el kit BIOLISA HTLV I/II DBS para el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas mediante otro método de inmunoensayo enzimático de referencia. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA HTLV I/II DBS es del 96,0% y la especificidad clínica es del 98,73%.

|                       |          | Resultado Referência |          |       |
|-----------------------|----------|----------------------|----------|-------|
|                       |          | Positivo             | Negativo | Total |
| BIOLISA HTLV I/II DBS | Positivo | 48                   | 2        | 50    |
|                       | Negativo | 1                    | 78       | 79    |
|                       | Total    | 49                   | 80       | 129   |

Sensibilidad Clínica: 96,0% (48/50) (IC 95% = 86,3 – 99,5%)  
Especificidad Clínica: 98,73% (78/79) (IC 95% = 93,1 – 100%)

**SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO**  
El virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) es un miembro de la familia Retroviridae y se clasifica en dos tipos: HTLV-1 y HTLV-2. Estos retrovirus infectan las células T humanas que son importantes para el sistema de defensa del cuerpo. Por tanto, el HTLV-1 tiene preferencia por las células CD4+ y el HTLV-2 por las células CD8, ambos con capacidad de integrarse en el genoma de la célula huésped y ahora se denominan provirus. Su transmisión puede ser tanto vertical como horizontal a través de relaciones sexuales, leche materna, transfusión de sangre y/o consumo de drogas intravenosas. Las principales patologías provocadas por estos virus son la leucemia de células T del adulto (ALLcTA), la uveítis, además de otras manifestaciones como la dermatitis infecciosa.

**REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**  
1- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR  
2- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.  
3- Lopes B, Rezende P, Pereira L e Lemos J. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical39(6):548-552, nov-dez, 2006.  
4- Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1  
5- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.  
6- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

**GARANTÍA DE CALIDAD**  
Antes de ser despachados al consumo, todos los reactivos de **Bioclin** son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está garantizada hasta la fecha de vencimiento mencionada en el empaque de presentación, siempre y cuando sean almacenados y transportados en condiciones adecuadas.

 **QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**  
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail:bioclin@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

**ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR**  
Servicio de Asesoría al Cliente  
Tel. : 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro del kit BIOLISA HTLV I/II DBS en la ANVISA: 10269360448

**Revisión:** Marzo/2024

## SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

|                                                                                       |                                               |                                                                                       |                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|    | NÚMERO DE CATALOGO                            |    | FABRICADO POR                               |
|    | NÚMERO DE LOTE                                |    | CONTROLAR                                   |
|    | FECHA DE FABRICACIÓN                          |    | CONTROL POSITIVO                            |
|  | FECHA DE VALIDEZ<br>(último día del mes)      |  | CONTROL NEGATIVO                            |
|  | LÍMITE DE TEMPERATURA<br>(tienda)             |  | RIESGO BIOLÓGICO                            |
|  | EL CONTENIDO ES SUFICIENTE<br>PARA <N> PRUEBA |  | INFLAMABLE                                  |
|  | VER INSTRUCCIONES<br>DE USO                   |  | CORROSIVO                                   |
|  | PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO<br>IN VITRO           |  | TÓXICO                                      |
|  | PROTEGER DE<br>LUZ Y CALOR                    |  | NO UTILICE SI EL<br>EMBALAJE ESTÁ<br>DAÑADA |
|  | NO REUTILIZA                                  |  | PRODUCTO<br>ESTERILIZADO                    |
|  | PRECAUCIÓN                                    |  | PELIGRO                                     |

BIOLISA HTLV I/II DBS

REF K257

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION

Enzyme-linked immunosorbent test (ELISA) for qualitative determination of total antibodies (IgG, IgA and IgM) to the HTLV I and HTLV II viruses in dried blood samples collected on filter paper (DBS). Only for *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE OF ACTION

**Methodology:** Enzyme immunoassay or enzyme immunoassay  
The BIOLISA HTLV I/II DBS kit is a solid phase enzyme immunoassay based on the sandwich principle of qualitative detection of total antibodies (IgG, IgA and IgM) to HTLV I/II in human dried blood samples collected on filter paper. Total antibodies (IgG, IgA and IgM) present in the dried blood sample are eluted and bind to the recombinant HTLV I/II antigens coated on the microplate, forming immune complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Recombinant antigens conjugated to Peroxidase are added to the microplate, which is then incubated. The enzyme-conjugated recombinant antigens bind to the Anti-HTLV I/II total antibodies (IgG, IgA and IgM) present, bound to the antigen-coated plate. New washing is carried out to remove excess. After this step, the Substrate is added and incubated, producing a blue color that indicates the amount of total Anti-HTLV I/II Antibodies (IgG, IgA and IgM) present in the sample. The Stop Solution is added to stop the reaction and there is a color change from blue to yellow. Color intensity is measured at 450/620 nm.

REAGENTS

- 1- Sensitized Plate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Sensitized Plate with recombinant HTLV I/II antigen and preservative.
- 2- Conjugate** - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution containing recombinant HTLV I/II antigens linked to peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
- 3- Concentrated Washing** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.
- 4- Substrate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
- 5- Stop Solution** - Store between 2 and 8°C. Contains: 1 M Hydrochloric Acid.
- 6- Elution Buffer** - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, surfactant, stabilizer and preservative.
- 7- DBS Negative Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Non-reactive sample for total antibodies (IgG, IgA and IgM) Anti-HTLV I/II impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**
- 8- DBS Positive Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Reactive sample for total antibodies (IgG, IgA and IgM) Anti - HTLV I/II impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**

PRESENTATION

| REAGENTS                | 1              | 2               | 3               |
|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                         | 96 cavities    | 192 cavities    | 480 cavities    |
| 1- Sensitized Plate     | 1 Unit         | 2 Units         | 5 Units         |
| 2- Conjugate            | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 3- Concentrated Washing | 1 Vial x 50 mL | 1 Vial x 100 mL | 1 Vial x 250 mL |
| 4- Substrate            | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 5- Stop Solution        | 1 Vial x 12 mL | 1 Vial x 24 mL  | 1 Vial x 60 mL  |
| 6- Elution Buffer       | 1 Vial x 24 mL | 1 Vial x 48 mL  | 1 Vial x 120 mL |
| 7- DBS Negative Control | 1 Unit         | 2 Units         | 3 Units         |
| 8- DBS Positive Control | 1 Unit         | 2 Units         | 3 Units         |

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

- Reagents described in the previous table

Required materials not contained in the kit:

- 1- Pipettes capable of dispensing volumes of 50 to 500 µL with a coefficient of variation of less than 1.5%.
- 2- Repipettor for repetitive pipetting of 500 µL volumes with a coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- 3- Microplate washer (optional).
- 4- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 620 nm wavelength.
- 5- Absorbent paper to dry the microcavities.
- 6- Stopwatch or clock.
- 7- Bottle to store the Washing Solution after dilution.
- 8- Distilled or deionized water.
- 9- Quality Control Tools.
- 10- Incubator 37 °C ± 2 °C.
- 11- Paper shredder (diameter 3 + 0.2 mm).

STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

The storage temperature should be 2 to 8 °C. Transport at temperatures up to 30 °C should not exceed 5 days. Keep away from light and avoid moisture. **Do not freeze.**

SPECIAL CARES

- 1- For *in vitro* diagnostic use only.**
- 2- Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- 3- The sachet containing the microplate must only be opened after reaching room temperature. Return the unused microcavity strips to the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
- 4- The water used to clean the material must be recent and free from contaminants.
- 5- Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
- 6- The Stop Solution contains Hydrochloric Acid which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.
- 7- All raw materials for the product are tested and are non-reactive for HBsAg, Anti-HIV 1&2 and Anti HCV. However, these tests do not offer complete assurance of the absence of infectious agents. The handling of any product that contains a biological sample is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, it is necessary to take appropriate biosafety precautions when handling these products.

- 8- Always pipette the reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between the microcavities.
- 9- As a protective measure, the plate must be covered during the reaction.
- 10- It must be ensured that the bottom of the cavity is clean and dry and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the test.
- 11- Do not expose the reagents, especially the Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation stages.
- 12- We recommend applying local, state and federal environmental protection standards so that reagents and biological material are disposed of in accordance with current legislation.
- 13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the SDS (Safety Data Sheet) available on the website [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) or through a request through SAC (Customer Advisory Service) from Quibasa.
- 14- Do not use the product if the packaging is damaged.
- 15- It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

**Dried blood collected on filter paper (DBS) – EDTA or Puncture**  
The filter paper used must be specific for collecting dried blood samples, such as the S&S 903 and Ahlstrom 226 models. The laboratory must certify the quality of the samples before use.  
Blood samples dried on filter paper can be stored at room temperature as long as they are protected from direct sunlight and in low humidity. For storage of up to 2 years, samples must remain refrigerated, between 2 and 8 °C. Storage for more than 2 years must be carried out at a temperature of -20 °C.

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Opening

The stability test results prove that the BIOLISA HTLV I/II DBS kit is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary depending on test and environmental conditions. Therefore, it is suggested to monitor the product's performance using the kit's internal controls and the technique validation criteria.

PREPARATION OF WORKING REAGENTS

Washing Solution

Dilute the contents of bottle No. 3 (Concentrated Washing) in a 1:20 ratio of distilled or deionized water; for example: 50 mL of Concentrated Washing solution in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored between 2 and 30 °C for up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolved.

All other reagents are ready to use.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult SAC (Customer Advisory Service).

- Before starting the assay, place all reagents, Controls and Samples to stabilize at room temperature (15 – 30°C) for at least 40 minutes.
- 1- Separate the cavities to be used considering: DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood samples collected on filter paper (it is recommended to test in duplicate). Return unused microplate strips to the original sealed packaging.
- 2- Separate the first cavity for the Blank (OPTIONAL).
- 3- Add a 3mm disc of DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood samples collected on filter paper, previously perforated, into the determined cavities.
- 4- Pipette 200 µL of Elution Buffer into all wells.
- 5- Homogenize gently for ± 30 seconds, cover the wells with plate sealer.
- 6- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
- 7- Remove the sealer from the cavities.

- 8- Discard the contents of the cavities by vacuuming (Washer for filter paper technique). Use approximately 500 µL of Washing Solution, **previously prepared**, and perform a total of five (5) wash and soak cycles of 30 seconds for each cycle. To ensure the plate dries, at the end of washing, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
- Note:** Poor washing/drying may cause inadequate results.
- 9- Pipette 100 µL of Conjugate into all wells, including the Blank well.
- 10- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
- 11- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- 12- Remove the plate sealer from the cavities.
- 13- Repeat item 8.
- 14- Pipette 100 µL of Substrate into all wells.
- 15- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
- 16- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
- 17- Remove the plate sealer from the cavities.
- 18- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
- 19- Gently homogenize for ± 30 seconds.
- 20- Read using a double filter: 450 nm / 620 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE CHECK

Check whether the results obtained for reading the Blank and Controls are compatible with the values presented below:

| ITEM                 | ABSORBANCES |
|----------------------|-------------|
| Blank                | < 0.300     |
| DBS Negative Control | < 0.300     |
| DBS Positive Control | > 1.000     |

If the values are outside the expected values, the technique must be repeated.

CALCULATIONS

QUALITATIVE

Calculate Cut Off according to the following formula:

Cut Off = Mean Absorbance of DBS Negative Control + 0.200.

Example:

| ITEM                                                      | ABSORBANCES                          |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| DBS Negative Control                                      | 0.102                                |
|                                                           | 0.104                                |
| Cut Off = Mean Absorbance of DBS Negative Control + 0.200 | [(0.102 + 0.104) /2] + 0.200 = 0.303 |

Calculate the Index by dividing the sample absorbance by the Cut Off value. Example:

| ITEM                           | ABSORBANCES          |
|--------------------------------|----------------------|
| Sample                         | 0.953                |
| Cut Off Value                  | 0.303                |
| Index = Sample / Cut Off Value | 0.953 / 0.303 = 3.14 |

**Note:** The data presented in the examples are for illustration only and cannot be used to calculate results.  
Each laboratory must validate the cut-off according to the instrumentation used and the population researched.

INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the sample index, consider the indexes below to determine the results.

| RESULTS                 | QUALITATIVE |
|-------------------------|-------------|
|                         | INDEX       |
| Negative (Non-Reactive) | ≤ 0.8       |
| Undetermined            | 0.8 and 1.2 |
| Positive (Reagent)      | ≥ 1.2       |

Samples with an index greater than or equal to 1.2 are considered positive, samples with an index less than or equal to 0.8 are considered negative and samples with an index between 0.8 and 1.2 are considered indeterminate. Therefore, the sample mentioned in the example, whose absorbance was 0.953 and index of 3.77, presents a positive result (index ≥ 1.2).

**Note:** In the case of an indeterminate result, the sample must be re-analyzed. Samples that yield repeatedly indeterminate results should be retested using an alternative method. If the results remain indeterminate, a new sample should be collected within two weeks. The result of the last sample collected must prevail. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, and are not the only criteria for determining the patient’s diagnosis and/or treatment.

PROCESS LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be established based on a single test. Other confirmatory tests must be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information before definitive diagnosis of the disease.

INTERFERENCES

No interference was observed for concentrations of Triglycerides 1200 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 2 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Rheumatoid Factor 980 IU/mL, C-Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 IU/mL.

CROSS REACTIVITY

A study was carried out with 95 samples that were negative for HTLV I/II, but positive for other infections. Among them 15 positive samples for Human Immunodeficiency Virus (HIV), 10 positive samples for HBsAg, 10 positive samples for Syphilis, 10 positive samples for Hepatitis C (HCV), 10 positive samples for Chagas Disease, 10 positive samples for Zika, 10 samples positive for Cytomegalovirus (CMV), 10 samples positive for Rubella, 10 samples positive for Toxoplasmosis. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis must consider the patient’s clinical data together with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to highlight that all measurement systems present a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. To this end, it is recommended to use controls, which allow evaluating the precision and accuracy of the dosages.

PRODUCT PERFORMANCE

PRECISION

Repeatability

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

| Repeatability                | SAMPLE |        |         |
|------------------------------|--------|--------|---------|
|                              | 1      | 2      | 3       |
| Average                      | 0.4680 | 1.6336 | 0.1242  |
| Standard Deviation           | 0.0425 | 0.0553 | 0.0131  |
| Coefficient of Variation (%) | 9.0889 | 3.3824 | 10.5328 |

Reproducibility

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

| Reproducibility              | SAMPLE |        |        |
|------------------------------|--------|--------|--------|
|                              | 1      | 2      | 3      |
| Average                      | 0.4653 | 1.6090 | 0.1210 |
| Standard Deviation           | 0.0307 | 0.0570 | 0.0073 |
| Coefficient of Variation (%) | 6.6015 | 3.5453 | 6.0205 |

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The BIOLISA HTLV I/II DBS kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed using another reference enzyme immunoassay method. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA HTLV I/II DBS kit is 96.0% and the clinical specificity is 98.73%.

|                          |          | Reference Result |          |       |
|--------------------------|----------|------------------|----------|-------|
|                          |          | Positive         | Negative | Total |
| BIOLISA<br>HTLV I/II DBS | Positive | 48               | 2        | 50    |
|                          | Negative | 1                | 78       | 79    |
|                          | Total    | 49               | 80       | 129   |

Clinical Sensitivity: 96.0% (48/50) (95% CI = 86.3 – 99.5%)

Clinical Specificity: 98.73% (78/79) (95% CI = 93.1 – 100%)

DIAGNOSTIC MEANING

Human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV) is a member of the Retroviridae family and is classified into two types: HTLV-1 and HTLV-2. These retroviruses infect human T cells that are important for the body’s defense system. Therefore, HTLV-1 has a preference for CD4+ cells and HTLV-2 for CD8 cells, both with the ability to integrate into the host cell’s genome and are now called proviruses. Its transmission can be both vertical and horizontal through sexual intercourse, breast milk, blood transfusion and/ or intravenous drug use. The main pathologies caused by these viruses are adult T-cell leukemia (ALLcTA), Uveitis, in addition to other manifestations such as infectious dermatitis.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCE

- 1- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8): 1337–44.2017 AACR
- 2- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- 3- Lopes B, Rezende P, Pereira L e Lemos J. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical39(6):548-552, nov-dez, 2006.
- 4- Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1
- 5- TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
- 6- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** reagents are tested by the Quality Control Department. The quality of the reagents is guaranteed until the expiration date mentioned on the presentation packaging, as long as they are stored and transported under appropriate conditions.



**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail:bioclin@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service  
Phone.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for BIOLISA HTLV I/II DBS kit: 10269360448

**Review:** March/2024

UNIVERSAL SYMBOLOGY

|  |                                          |  |                                        |
|--|------------------------------------------|--|----------------------------------------|
|  | CATALOG NUMBER                           |  | MADE BY                                |
|  | LOT NUMBER                               |  | CONTROL                                |
|  | MANUFACTURING DATE                       |  | POSITIVE CONTROL                       |
|  | VALIDITY DATE<br>(last day of the month) |  | NEGATIVE CONTROL                       |
|  | TEMPERATURE LIMIT<br>(store)             |  | BIOLOGICAL RISK                        |
|  | CONTENT IS SUFFICIENT<br>FOR <N> TEST    |  | FLAMMABLE                              |
|  | SEE INSTRUCTIONS<br>FOR USE              |  | CORROSIVE                              |
|  | IN VITRO DIAGNOSTIC<br>PRODUCT           |  | TOXIC                                  |
|  | KEEP AWAY<br>FROM SUNLIGHT               |  | DO NOT USE IF<br>PACKAGE IS<br>DAMAGED |
|  | DO NOT REUSE                             |  | PRODUCT<br>STERILIZED                  |
|  | CAUTION                                  |  | DANGER                                 |