



Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II

Legenda dos símbolos utilizados

	Número de catálogo		Consulte as instruções de utilização
	Código do lote		Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Data de validade		Controlo positivo
	Limite de temperatura		Controlo negativo
	Não contém látex		Contém o suficiente para <n> testes
	Atenção		Proteger da luz solar

Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

O sistema microelisa Avioq HTLV-I/II é um ensaio imunoenzimático (ELISA) qualitativo para detecção de anticorpos para vírus linfotrópico humano de células T tipo I (HTLV-I) e/ou vírus linfotrópico humano de células T tipo II (HTLV-II) em soro e plasma humanos e amostras cadavéricas. Destina-se à triagem de doadores humanos, incluindo doadores voluntários de sangue total e componentes de sangue e doadores vivos para a presença de anti-HTLV-I/HTLV-II e para uso como auxiliar em diagnóstico clínico de infecção por HTLV-I ou HTLV-II e doenças relacionadas. Destina-se também para uso em amostras de soro e plasma para triar doadores de órgãos quando as amostras são obtidas quando o coração do doador ainda bate e para testar amostras de doadores cadavéricos (sem batimento cardíaco). Não se destina para uso em amostras de sangue do cordão umbilical. Além de ser usado como ensaio Manual, o ensaio também se destina ao uso com o sistema ORTHO® Summit (OSS) para triagem de doadores de sangue.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O HTLV-I, um retrovírus humano tipo C, foi etiológicamente associado à leucemia de células T do adulto (ATL)¹⁻⁴ e à doença neurológica desmielinizante chamada paraparesia espástica tropical e/ou mielopatia associada ao HTLV-I (TSP/HAM). Os anticorpos para HTLV-I são encontrados com alta frequência em pessoas afetadas por essas doenças. No entanto, é bem estabelecida em estudos de áreas endémicas virais a observação de ATL e TSP/HAM negativos para vírus. Mais recentemente, a infecção por HTLV-I mostrou-se associada à leucemia linfática crónica de células T (CLL)^{5,6}, mieloma múltiplo⁷, alguns casos de linfoma não-Hodgkin (NHL)⁸, polimiosite⁹, artrite^{10,11}, sarcoma de Kaposi¹², uveíte¹³, estrongiloidíase⁵ e micose fungóide^{14,15}. HTLV-I é endémico em alguns países das Caraíbas, sul do Japão e possivelmente algumas regiões de África¹⁶⁻²¹. Nos Estados Unidos, o HTLV-I foi identificado em pacientes com ATL, toxicodependentes por via intravenosa e indivíduos saudáveis.

HTLV-II, um vírus relacionado, é endémico em várias tribos de ameríndios²²⁻²⁵, mas não se comprovou, de modo inequívoco, ser um patógeno. Foi observada uma alta taxa de seropositivos para HTLV-II entre toxicodependentes por via intravenosa²⁶⁻²⁸. Os primeiros pacientes relatados com infecções por HTLV-II apresentavam uma variante de célula T atípica de leucemia de células pilosas. Observações mais recentes levaram à suposição de que o HTLV-II pode estar associado à leucemia linfocítica granular T (LGL)²⁹, leucemia leucopénica crónica de células T³⁰, leucemia prolinfocítica T³¹, micose fungóide¹⁴ e doenças neurodegenerativas crónicas^{32,33} como mielopatia³⁴ e ataxia espástica³⁵. Anticorpos para HTLV-II apresentam reação cruzada significativa com antígenos HTLV-I.

A transmissão de infecções por HTLV-I e HTLV-II para recetores de produtos sanguíneos infetados é bem documentada. Outros modos conhecidos de transmissão incluem leite materno, contacto sexual e partilha de agulhas e seringas contaminadas por toxicodependentes por via intravenosa. Suspeita-se da transmissão perinatal, mas ainda não está demonstrada.

PRINCÍPIO DO TESTE

O Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II é um ensaio imunoenzimático no qual a fase sólida (micropoços) é revestida com um lisado viral de HTLV-I purificado, um lisado viral de HTLV-II purificado e um antígeno recombinante HTLV-I p21E.

Com a adição de uma amostra de teste diluída contendo anticorpos para HTLV-I ou HTLV-II, formam-se complexos pela interação dos anticorpos na amostra com os antígenos da fase sólida. Após a incubação, a amostra é aspirada e o poço é lavado com tampão. Posteriormente, imunoglobulinas de cabra anti-humanas conjugadas com peroxidase de rábano silvestre (HRP) são adicionadas ligando-se ao complexo anticorpo-antígeno durante uma segunda incubação. Após uma lavagem e incubação com substrato de TMB (tetrametilbenzidina), produz-se uma cor azul. A reação enzimática é interrompida pela adição da solução de ácido sulfúrico, que altera a cor para amarelo. A quantidade de anticorpos específicos para HTLV-I ou HTLV-II presente na amostra é proporcional à intensidade da cor.



REAGENTES

Componentes de cada kit do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II

192 testes	576 testes	9600 testes	
2 suportes de tira	6 suportes de tira	100 suportes de tira	Tiras para microelisa HTLV-I/II – Doze por suporte, cada uma contendo 8 poços revestidos com lisado viral de HTLV-I inativo, um antígeno HTLV-I recombinante (rp21E) e lisado viral de HTLV-II inativo embaladas numa bolsa de alumínio com excicante de sílica gel.
1 ampola (50 mg)	2 ampolas (50 mg cada)	4 ampolas (50 mg cada)	EnzAbody® para HTLV-I/II (concentrado EnzAbody) – peroxidase de rábano silvestre conjugada com imunoglobulina de cabra anti-humana, ~0,06% p/p ou 30 µg liofilizada com soro de cabra, sacarose e leite em pó desnatado.
1 frasco (55 ml)	2 frascos (55 ml cada)	28 frascos (55 ml cada)	Diluente EnzAbody® – solução salina tamponada com fosfato contendo soro de cabra 10% e surfactantes não iônicos. Conservantes: sulfato de gentamicina 0,2% e cinamaldeído 0,02%.
1 frasco (100 ml)	2 frascos (100 ml cada)	16 frascos (100 ml cada)	Diluente simples – solução salina tamponada com fosfato contendo soro de cabra 10%, surfactantes não iônicos, cloreto de sódio, albumina de soro bovino 0,14%, leite em pó desnatado e corante amaranth. Conservante: bromonitrodioxano 0,03% (p/v).
1 frasco (22 ml)	2 frascos (22 ml cada)	34 frascos (22 ml cada)	Solução de TMB – ácido cítrico contendo tetrametilbenzidina•2HCl 0,03%.
1 frasco (22 ml)	2 frascos (22 ml cada)	34 frascos (22 ml cada)	Solução de peróxido – ácido cítrico/tampão de citrato de sódio contendo peróxido de ureia 0,04%.
1 ampola	2 ampolas	17 ampolas	Soro de controlo negativo – soro humano com

(1,5 ml)	(1,5 ml cada)	(1,5 ml cada) CONTROL -	estabilizadores de proteína; não reativo por testes autorizados pela FDA para HTLV-I, HTLV-II, HIV-1, HIV-2, HCV e não reativo para HBsAg e HIV-Ag. Conservante: bromonitrodioxano 0,05% (p/v).
----------	---------------	-----------------------------------	---

192 testes	576 testes	9600 testes	
1 ampola (1,0 ml)	1 ampola (1,0 ml)	12 ampolas (1,0 ml cada) CONTROL +	Soro de controlo positivo HTLV-I – soro humano inativo com estabilizadores de proteína e corante vermelho amaranço; reativo para anticorpos para HTLV-I; não reativo por testes autorizados pela FDA para HIV-1, HIV-2, HCV e não reativo para HBsAg e HIV-Ag. Pode ocorrer reação cruzada com antígeno HTLV-II. Conservante: bromonitrodioxano 0,05% (p/v).
1 ampola (1,0 ml)	1 ampola (1,0 ml)	12 ampolas (1,0 ml cada) CONTROL +	Soro de controlo positivo HTLV-II – soro humano inativo com estabilizadores de proteína e corante azul patente; reativo para anticorpos para HTLV-II; não reativo por testes autorizados pela FDA para HIV-1, HIV-2, HCV e não reativo para HBsAg e HIV-Ag. Pode ocorrer reação cruzada com antígeno HTLV-I. Conservante: bromonitrodioxano 0,05% (p/v).
1 de cada	1 de cada	5 de cada	Presilha e haste (ou equivalente) – fecho para a embalagem de alumínio.
10 folhas	20 folhas	30 folhas	Seladores de placa – adesivo.

Observação: O tampão de lavagem concentrado é fornecido como acessório ao kit.

Tampão de lavagem concentrado, número de produto 559879, composto por 1 frasco (100 ml)

Tampão de lavagem concentrado, número de produto 559880, composto por 4 frascos (4 x 100 ml)

Observação: A solução de paragem é ácido sulfúrico 2 N, não fornecida pela Avioq. Não use nenhuma outra solução de paragem para este ensaio.



ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. **Atenção: Manuseie todos os materiais biológicos HTLV-I/II da Avioq como capazes de transmitir agentes infecciosos.** Os antígenos usados para revestir os poços para microelisa foram inativados para vírus por rutura com detergente; os **soros de controlo positivo HTLV-I e HTLV-II** foram inativados por adição de detergente. Os controlos positivo e negativo derivam de soro ou plasma humano e foram testados para antígeno HIV-1, HBsAg, anti-HIV-1, anti-HIV-2 e anti-HCV, testes autorizados pela FDA mostraram que são não reativos. Como nenhum método de teste pode oferecer garantia completa de ausência de agentes infecciosos, todos os materiais de origem humana devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos.
2. Todos os operadores de teste devem cumprir os regulamentos da OSHA (Administração de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos) (29 CFR 1910.1030).
3. Mantenha a área de teste separada da área onde são armazenados sangue e derivados para transfusão.
4. Não pipete nenhum dos materiais com a boca. Não fume, coma ou beba em áreas onde são manuseados amostras ou reagentes do kit.
5. Não realize o teste na presença de vapores reativos (hipoclorito de sódio, ácidos, álcalis ou aldeídos, por exemplo) ou pó, porque a atividade enzimática do conjugado pode ser afetada.
6. Use luvas descartáveis e manuseie todos os materiais usados no teste (incluindo amostras, controlos, solução de lavagem, tiras e suportes para tira microelisa e pipetas) como capazes de transmitir agentes infecciosos. Consulte imediatamente um médico em caso de ingestão desses materiais ou de contacto destes com lacerações ou lesões abertas ou outros ferimentos na pele, membranas mucosas ou olhos.
7. Limpe imediatamente qualquer derramamento de material contendo antígenos ou anticorpos usando uma diluição 1:10 de hipoclorito de sódio 5% (concentração final 0,5%) ou desinfetante equivalente para descontaminar. Elimine o material de limpeza usando um método aceitável.
8. Elimine todos os materiais que entraram em contacto com amostras e reagentes de acordo com as regulamentações locais, estatais e federais³⁷. Resíduos sólidos podem ser incinerados ou submetidos a autoclave por um período apropriado. Devido às variações de configuração entre autoclaves e resíduos, cada usuário deve confirmar a eficácia desse ciclo de descontaminação usando indicadores biológicos.³⁸

Observação: Resíduos líquidos contendo ácido devem ser neutralizados antes da adição de desinfetantes e/ou eliminação.
9. Alguns componentes deste kit contêm pequenas concentrações de produtos químicos perigosos (tampão de lavagem concentrado, solução de peróxido, solução de TMB). Consulte a Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) para obter mais informações específicas. Entre em contacto com a Avioq Inc. para obter uma FISPQ.
10. **Ácido sulfúrico 2 N** – o ácido sulfúrico é corrosivo e deve ser manuseado com cuidado para evitar a exposição de pele e olhos. Se este reagente entrar em contacto com a pele ou olhos, lave abundantemente com água.
11. Tenha cuidado ao montar as microplacas para execuções de placas parciais (mistura de tiras com e sem revestimento). Alguns analisadores poderão não conseguir detetar a diferença entre poços com e sem revestimento e poderão produzir resultados para qualquer posição de poço com um controlo ou número de ID atribuído.

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Prepare os reagentes antes, durante ou após o procedimento do ensaio. Reagentes e amostras devem estar em temperatura ambiente (15-30 °C) antes da diluição/preparação e antes do início do teste, e podem permanecer a temperatura ambiente durante os testes. Devem-se preparar reagentes em quantidade suficiente para concluir o número desejado de testes. Recoloque os reagentes em temperatura de 2-8 °C após o uso.

Preparação de EnzAbody concentrado

1. Pipete 4,0 ml de **diluyente EnzAbody** em 1 ampola de **EnzAbody concentrado** liofilizado. Misture bem o conteúdo. Evite a formação excessiva de espuma. Após a reconstituição, aguarde 30 minutos para a reidratação do **EnzAbody concentrado**. Não manuseie a ampola de **EnzAbody concentrado** com luvas que entraram em contacto com soro ou plasma.
2. Registe a data de preparação e a data de validade na ampola. O EnzAbody concentrado reconstituído é estável durante 5 semanas quando armazenado a 2-8 °C.

Preparação da solução de trabalho EnzAbody

1. Devem ser usados recipientes de polipropileno limpos, de preferência descartáveis. **Não use recipientes de poliestireno.** Quando usar o processador de microplacas automático, consulte as recomendações do fabricante em relação ao uso de recipientes. Transfira uma quantidade apropriada de **diluyente EnzAbody** para o recipiente e adicione uma quantidade apropriada de **EnzAbody concentrado** para formar uma **solução de trabalho de EnzAbody 1:251** (ver tabela abaixo). O **EnzAbody concentrado** reconstituído deve ser bem misturado antes de usar. Volte a colocar o **EnzAbody concentrado** reconstituído não utilizado à temperatura de 2-8 °C. Não misture ampolas de **EnzAbody concentrado reconstituído**. Pode ser necessário mais **solução de trabalho de EnzAbody**, dependendo do dispensador de reagente usado.

Preparação da solução de trabalho EnzAbody

Número de tiras microelisa	Volume de EnzAbody concentrado reconstituído	Volume de diluyente EnzAbody
2	10 µl	2,5 ml
3	20 µl	5,0 ml
6	25 µl	6,25 ml
9	30 µl	7,5 ml
12	50 µl	12,5 ml

Número de placas	Volume de EnzAbody concentrado reconstituído	Volume de diluyente EnzAbody
1	50 µl	12,5 ml
2	100 µl	25,0 ml
4	200 µl	50,0 ml
6	300 µl	75,0 ml
10	500 µl	125,0 ml

2. Depois de preparada, a **solução de trabalho de EnzAbody** é estável por quatro horas à temperatura ambiente. Registe a data de preparação e a validade da **solução de trabalho EnzAbody**. Elimine o restante da **solução de trabalho EnzAbody** não utilizada após a conclusão do ensaio.

Preparação de tampão de lavagem

Importante! O **tampão de lavagem concentrado** é formulado especificamente para o ensaio Avioq HTLV-I/II. Não use nenhum outro tampão de lavagem para este ensaio.

1. Verifique a presença de cristais ou precipitado no **tampão de lavagem concentrado**. Se houver formação de cristais ou precipitado na solução, aqueça-a a 37 °C até à dissolução dos cristais ou precipitado. Misture o **tampão de lavagem concentrado** antes de diluir.
2. Dilua o **tampão de lavagem concentrado** 1:25 em água purificada³⁹, de acordo com a tabela abaixo.

Preparação do tampão para lavagem

Número de tiras microelisa	Volume do tampão de lavagem concentrado	Volume de água purificada	Volume total de tampão de lavagem
1-6	7 ml	168 ml	175 ml
7-12	14 ml	336 ml	350 ml

Número de placas	Volume do tampão de lavagem concentrado	Volume de água purificada	Volume total de tampão de lavagem
1	14 ml	336 ml	350 ml
2	28 ml	672 ml	700 ml
4	56 ml	1344 ml	1400 ml
6	84 ml	2016 ml	2100 ml
10	140 ml	3360 ml	3500 ml

O volume total de **tampão de lavagem** não inclui nenhum volume adicional necessário para uma lavadora automática (preparação, volume morto, etc.) Consulte as instruções do fabricante para a lavadora de placas microelisa.

3. O **tampão de lavagem** é estável durante duas semanas quando armazenado a 2-30 °C. Registe a data de preparação e a data de validade.



Preparação de substrato de TMB

Prepare o **substrato de TMB** num recipiente de polipropileno limpo, preferivelmente descartável. **Não use recipientes de poliestireno.** Transfira uma quantidade suficiente de **solução de peróxido** para um recipiente, adicione uma quantidade apropriada de **solução de TMB** à **solução de peróxido** e misture bem antes de usar (ver tabela abaixo).

Cada placa de micropoços requer no mínimo 10 ml de **substrato de TMB**. Pode ser necessário mais **substrato de TMB**, dependendo do dispensador de reagente usado. Consulte os requisitos adicionais em relação aos reagentes nas instruções do fabricante do instrumento.

Preparação de substrato de TMB

Número de tiras microelisa	Volume de solução de TMB	Volume de solução de peróxido
2	1 ml	1 ml
3	2 ml	2 ml
6	3 ml	3 ml
9	5 ml	5 ml
12	6 ml	6 ml

Número de placas	Volume de solução de TMB	Volume de solução de peróxido
1	6 ml	6 ml
2	12 ml	12 ml
4	24 ml	24 ml
6	36 ml	36 ml
10	60 ml	60 ml

O **substrato de TMB** é estável durante 6 horas quando mantido a temperatura ambiente e deve ser incolor quando usado. Registe a data de preparação e a validade. Se a cor for visivelmente azul, descarte e prepare mais **substrato de TMB** conforme necessário.

Observação: A **solução de TMB** e o **substrato de TMB** devem ser protegidos da exposição à luz. Evite o contacto com metais ou iões metálicos, pois pode resultar na formação de cor azul indesejada.

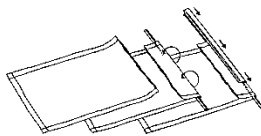
INSTRUÇÕES PARA ARMAZENAMENTO DO KIT

Armazene todos os componentes a 2-8 °C quando não estiverem a ser utilizados. A data de validade impressa no kit indica a data limite para uso do produto. A estabilidade dos reagentes do kit após a reconstituição ou diluição está indicada em "PREPARAÇÃO DE REAGENTES". Não congele.

TIRAS MICROELISA PARA HTLV-I/II

A embalagem de alumínio deve estar em temperatura ambiente (15-30 °C) antes de abrir, para evitar a condensação nas **tiras microelisa**. Após a abertura da embalagem hermética de alumínio, as **tiras** são estáveis por 4 semanas a 2-8 °C, se a embalagem de alumínio for fechada com a presilha e a haste fornecidas ou equivalente. Registre a data de abertura e a data de validade na embalagem de alumínio. **O saco de sílica gel não deve ser removido.**

Figura 1: Fecho da embalagem de alumínio.



1 2 3

Dobre a extremidade aberta da embalagem de alumínio sobre a haste.
Prenda com a presilha.

INDICAÇÕES QUÍMICAS OU FÍSICAS DE INSTABILIDADE

Alterações na aparência física dos materiais do kit de teste podem indicar instabilidade ou deterioração. As datas de validade impressas nos rótulos dos reagentes do kit indicam a data limite para uso do produto.

Se a cor do **substrato de TMB** for visivelmente azul, descarte e prepare mais **substrato de TMB** conforme necessário.

COLHEITA, ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Amostras de doadores vivos

Colheita: Não é necessária preparação especial ou jejum do paciente. Podem ser usados soro ou plasma derivados de heparina, citrato, CPD, CPDA-1 ou EDTA (etilenodiaminotetra-acetato) como anticoagulantes. Consulte as instruções fornecidas pelo fabricante de tubos de colheita de amostras para informações sobre a proporção correta entre volume de amostra e anticoagulante a ser usada. Remova o soro ou plasma do coágulo ou dos eritrócitos assim que possível, para evitar hemólise. Podem ser usadas amostras de tubos separadores de plasma ou tubos de bolsas de sangue segmentado. O Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II não é afetado por níveis elevados de lipídios (3.000 mg/dl), bilirrubina total (20 mg/dl), fator reumatoide ou hemoglobina (3.051 mg/dl). As amostras podem ser inativadas por calor por 30 minutos a 56 °C, sem perda da reatividade. Não foi estabelecido o desempenho para outros tipos de amostra, incluindo amostras de fluido pleural, saliva, fluido oral, eluatos de gotas de sangue seco e amostras não humanas.

Armazenamento: As amostras devem estar livres de contaminação microbiana e podem ser armazenadas a 2-8 °C até durante 14 dias. Para armazenamento de longo prazo, as amostras devem ser congeladas a -20 °C e misturadas após o descongelamento. As amostras podem ser congeladas e descongeladas uma vez sem perda de reatividade. No entanto, amostras repetidamente congeladas e descongeladas ou aquelas que contêm partículas de material o podem apresentar resultados errôneos.

Transporte: As amostras devem ser embaladas para envio de acordo com os regulamentos aplicáveis referentes ao transporte de agentes etiológicos. As amostras podem ser transportadas em temperatura

ambiente, refrigeradas (2-8 °C) ou congeladas (-20 °C ou mais frio). Após receção, as amostras devem ser armazenadas à temperatura de armazenamento descrita acima.

Amostras de dadores cadavéricos

Colheita: As amostras cadavéricas podem ser colhidas a partir de soro, tubos separadores de soro, ou plasma EDTA. A preferência recai sobre amostras limpas não hemolisadas. Os precipitados nas amostras devem ser removidos através de centrifugação.

Armazenamento: As amostras cadavéricas podem ser armazenadas até 14 dias a temperaturas entre 2 °C e 8 °C, e a -20 °C sujeitas a 4 ciclos de congelamento/descongelamento. Misturar bem após o descongelamento e antes do início dos testes.

Transporte: As amostras para transporte têm de ser embaladas em conformidade com os regulamentos aplicáveis regendo o transporte de agentes etiológicos. As amostras podem ser transportadas a temperaturas entre -20 °C e 30 °C. Após a receção, as amostras devem ser armazenadas às temperaturas de armazenamento recomendadas num período não superior a um total de 14 dias, incluindo o tempo de transporte.

PROCEDIMENTO DO SISTEMA DE TESTE MICROELISA AVIOQ HTLV-I/II

Materiais fornecidos

Tiras microelisa para HTLV-I/II
EnzAbody® para HTLV-I/II
Diluyente EnzAbody®
Diluyente da amostra
Solução de TMB
Solução de peróxido
Soro de controlo negativo
Soro de controlo positivo para HTLV-I
Soro de controlo positivo para HTLV-II
Presilha e haste
Seladores de placa

Materiais adicionais necessários mas não fornecidos

Instrumentos/equipamentos

Observação: para qualquer instrumento, o manual fornecido pelo fabricante deve ser analisado para informações adicionais em relação a:

- Instalação e requisitos especiais;
- Princípios de operação, instruções, precauções e perigos;
- Especificações do fabricante e recursos de desempenho;
- Informações sobre reparações e manutenção;
- Controlo de qualidade.

Sistema automático de diluidor/dispensador ou equivalente

Sistema de aspiração/lavagem

O sistema de aspiração/lavagem deve ser capaz de distribuir um volume mínimo de 300 µl, e capaz de realizar um ciclo de impregnação de 30 ± 5 segundos. O resíduo aspirado deve ser confinado num sistema fechado.

Sistema de pipeta multicanal de volume variável ajustável capaz de dispensar 50 - 300 µl $\pm 5\%$ e pontas

Micropipetas capazes de dispensar 20 µl $\pm 5\%$, 100 µl $\pm 5\%$ e pontas

Incubadora – incubadora seca, bloco de aquecimento ou equivalente, capaz de manter 37 ± 2 °C.

Leitor de placas microelisa

Pode-se usar qualquer leitor de microelisa capaz de transmitir luz a $450 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ ou comprimento de onda duplo $450 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ e $620/630 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ como referência, com intervalo de absorvância linear de 0 a 2,000, um desvio inferior a 0,005% AU/h e uma largura de banda à meia altura de $10 \pm 2 \text{ nm}$.

Temporizador

Cilindro graduado, 50 ml e 1-2,5 l ou equivalente

Reagentes/descartáveis

Tampão de lavagem concentrado (número de produto 559879)

Ácido sulfúrico 2 N

Água purificada³⁹, USP, NCCLS Tipo I⁴¹ ou equivalente

Suporte para tira com poços não revestidos

Papel absorvente

Canaletas em V descartáveis ou equivalente

Luvas descartáveis

Solução de hipoclorito de sódio (5%), lixívia líquida ou desinfetante equivalente

Recipientes adequados para eliminação de material com risco biológico potencialmente contaminado por agentes infecciosos

Tubos de tampa descartáveis de polipropileno (15 ou 50 ml) ou equivalente

Materiais disponíveis a partir da Avioq Inc.

Tampão de lavagem concentrado, frasco de 100 ml (número de produto 559879)

Tampão de lavagem concentrado, 4 x frasco de 100 ml (número de produto 559880)

Notas de procedimento

1. O cumprimento inadequado das instruções da embalagem pode resultar em resultados errôneos ou ensaios inválidos.
2. **Tiras microelisa, EnzAbody para HTLV-I/II, diluente EnzAbody, diluente de amostra, solução de TMB, solução de peróxido e controles** usados num ensaio deve ser do mesmo lote mestre. O tampão de lavagem não é específico para um lote mestre e pode ser usado com qualquer número de lote mestre. Os materiais devem ser usados antes da data de validade impressa na embalagem. Os componentes e amostras para o teste devem estar à temperatura ambiente (15-30 °C) e misturados (conforme aplicável) antes do início do teste. Recoloque os reagentes à temperatura de 2-8 °C após o uso. Não congele.
3. As **tiras** da placa microelisa são removíveis. Armazene as **tiras** não utilizadas conforme descrito em "INSTRUÇÕES PARA ARMAZENAMENTO DO KIT". Antes do início do teste, inspecione o suporte para tiras microelisa e confirme se todas as tiras estão presas. Os suportes para tiras devem ser manuseados com cuidado, para que nenhuma tira seja deslocada durante o teste. As **tiras microelisa** podem ser numeradas para assegurar a reinserção caso sejam deslocadas.
4. As **tiras microelisa** e os **seladores de placa** apenas podem ser usados uma vez.
5. Para evitar contaminação, não toque na parte superior das **tiras** nem na borda dos poços com os dedos ou a ponta da pipeta.
6. Todos os reagentes e amostras devem ser bem misturados antes do uso. Os **controles positivo e negativo** podem ser agitados em vórtex antes da pipetagem. Os **controles positivo e negativo** devem ser distribuídos e diluídos da mesma maneira que as amostras. Deve haver um **controle positivo** e três **controles negativos** em cada placa (suporte para tiras). Se mais do que um suporte para tiras for processado, é preciso cumprir todos os tempos de incubação especificados.
7. Todas as etapas de pipetagem devem ser realizadas com o maior cuidado e precisão. A contaminação cruzada entre reagentes invalida os resultados dos testes. Use micropipetas para transferência quantitativa de amostras e reagentes. Para pipetagem manual de controles e amostras, use pontas individuais descartáveis para evitar a passagem de amostra. Evite contaminação microbiana ou qualquer outro tipo de contaminação dos reagentes.
8. Se, acidentalmente, uma amostra não for adicionada a este ensaio, por exemplo, se um poço for esquecido, o resultado do ensaio para essa amostra pode ser incorretamente interpretado como não reativo.
9. Evite abrir a porta da incubadora (37 °C) durante o tempo de incubação.
10. Evite a contaminação química de reagentes e equipamentos. A manutenção de rotina do sistema de aspiração/lavagem é altamente recomendada para evitar o transporte de anticorpos de espécimes altamente reativos para espécimes não reativos.
11. As lavadoras de microplaca devem ser enxaguadas com água em abundância após a conclusão da lavagem final do ensaio. Consulte as recomendações do fabricante para a manutenção do sistema de manuseamento de líquidos para processadores de microplacas automáticos.

12. A lavagem manual das placas deve ser validada antes do uso. Recomenda-se o uso de uma lavadora de placas automática (consulte os requisitos para a lavadora automática em **Materiais necessários mas não fornecidos**). Uma lavagem incompleta terá efeito negativo sobre o resultado do teste.
13. O ensaio deve ser realizado até ao final sem interrupção e dentro dos limites de tempo definidos na embalagem.
14. Não coloque restos de reagente nos frascos originais.
15. Não toque na superfície inferior externa dos micropoços. Impressões digitais ou riscos podem interferir com a leitura dos micropoços.
16. Verifique se as **tiras microelisa** estão niveladas com o suporte para tiras microelisa durante o procedimento do teste. Se necessário, limpe cuidadosamente a parte inferior das **tiras microelisa** com um tecido macio e absorvente que não liberte fios, para remover toda a humidade, pó ou resíduos antes da leitura. Se necessário, o tampão seco pode ser também removido. Para isso, antes da leitura limpe a parte inferior das **tiras microelisa** com um pano macio embebido em água, depois com um tecido seco, macio e que não liberte fios.
17. Valores de controlo negativo ou positivo que não estiverem dentro do intervalo esperado (consulte a secção Controlo de qualidade) podem indicar um problema na técnica ou deterioração do produto.
18. Todos os equipamentos de pipetagem devem ser usados com cuidado, calibrados regularmente e mantidos conforme as instruções do fabricante do equipamento.
19. O leitor de placas microelisa pode conter um filtro de referência de 620 nm ou 630 nm. Se for usado um instrumento sem filtro de referência, áreas opacas, riscadas ou irregulares na parte inferior dos micropoços podem causar leituras imprecisas.
20. Bolhas nos poços da **tira microelisa** podem causar leituras imprecisas dos micropoços. Deve-se ter cuidado para assegurar a ausência de bolhas.
21. Use somente com equipamentos corretamente calibrados.

Procedimento de lavagem

1. Uma lavagem incompleta terá efeito negativo sobre o resultado do teste. O **tampão de lavagem** deve estar à temperatura ambiente (15-30 °C) antes do uso.
2. Aspire o conteúdo do poço num frasco de resíduos. Depois encha os poços (aproximadamente 0,3 ml) com **tampão de lavagem** e aguarde a impregnação durante 30 ± 5 segundos, a menos que validado de outra forma. Aspire e repita o procedimento de lavagem e impregnação mais três vezes, totalizando quatro lavagens.
3. Confirme se as **tiras microelisa** foram completamente aspiradas antes da aspiração final. Inverta o suporte para tiras e bata com firmeza num papel de toalha limpo para absorver o excesso de **tampão de lavagem**, se necessário.

Procedimento de teste

1. Coloque o número necessário de **tiras microelisa** no suporte para tiras. Se forem necessárias menos de doze **tiras**, use tiras não revestidas para completar a placa ao usar a lavadora de 96 poços.
2. Prepare uma diluição 1:5 de cada amostra de teste e **controlo** usando um dos procedimentos indicados abaixo. Inclua três poços do **controlo negativo**, um poço do **controlo positivo HTLV-I** e um poço do **controlo positivo HTLV-II** em cada placa, não importa o número de tiras usadas. Misture bem os **controles** (em vórtex, por exemplo) antes de pipetar ou recolher uma alíquota para uso automatizado.

Atenção: Não deixe que os poços de **tiras microelisa** sequem depois do início do ensaio.

Adição direta de amostra

Método manual: Usando uma pipeta calibrada, adicione 80 µl de **diluyente de amostra** em cada poço do teste microelisa. Adicione 20 µl de amostra ou **controle** com uma ponta de micropipeta descartável. Misture a amostra com **diluyente de amostra**. Para isso, aspire e dispense repetidamente a amostra (pelo menos 3 ou 4 vezes) com cada adição.

Método automático: O diluidor/dispensador calibrado deve ser programado para dispensar uma diluição 1:5, normalmente 20 µl de amostra ou **controle** com 80 µl de **diluyente de amostra** em cada poço de **tiras microelisa**. A retenção da ponta da pipeta deve ser calculada, verificada e incluída na programação.

Observação: A amostra pode ser adicionada ao **diluyente de amostra** conforme descrito no método manual.

Adição indireta de amostra

Método manual: Pipete 120 µl de **diluyente de amostra** num tubo de ensaio limpo, seguidos por 30 µl de amostra ou **controle**. Misture bem o conteúdo. Amostras diluídas em tubos de tampa podem ser armazenadas até 24 horas a 2-8 °C, mas devem estar à temperatura ambiente (15-30 °C) no momento do teste. Pipete 100 µl da amostra diluída em cada poço de **tiras microelisa**.

3. Cubra as **tiras** com seladores adesivos para placa ou equivalente. Se usar **seladores de placa**, confirme se todos os poços estão cobertos. Dentro de 30 minutos, incube a 37 ± 2 °C por 60 ± 5 minutos.
4. Depois da incubação, descarte o selador de placa após o uso, se aplicável. Não reutilize. Lave e impregne cada poço quatro vezes com **tampão de lavagem** (consulte "Procedimento de lavagem").
5. Pipete 100 µl de **solução de trabalho de EnzAbody** em cada poço (consulte as instruções em "PREPARAÇÃO DE REAGENTES").

Atenção: Não permita que o **EnzAbody concentrado reconstituído** ou a **solução de trabalho de EnzAbody** contamine o **substrato de TMB**. Se o mesmo equipamento for usado para adicionar ambos os reagentes, use pontas novas descartáveis.

6. Cubra as **tiras** com um novo **selador de placa** ou equivalente. Se usar um **selador de placa**, confirme se todos os poços estão cobertos. Incube a 37 ± 2 °C por 60 ± 5 minutos.

Quando usado com o Sistema ORTHO® Summit (OSS), incube a 37 ± 2 °C por 30 ± 5 minutos.

7. Depois da incubação, descarte o **selador de placa** após o uso, se aplicável. Não reutilize. Lave e impregne cada poço quatro vezes com **tampão de lavagem**. Consulte "Procedimento de lavagem".
8. Pipete 100 µl de **substrato de TMB** em cada poço. Não cubra com selador de placa adesivo (consulte as instruções em "PREPARAÇÃO DE REAGENTES").
9. Incube em temperatura ambiente (15-30 °C) por 30 ± 5 minutos.
10. Para interromper a reação, adicione 100 µl de **ácido sulfúrico 2 N** a cada poço (mantenha a mesma sequência e intervalos de tempo usados para a adição de **substrato de TMB**). **As placas devem ser lidas até duas horas.**
11. Afira o leitor de microelisa com ar (sem suporte para tiras e sem **tiras**) e leia a absorvância da solução em cada poço a $450 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ (comprimento de onda único) ou $450 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ e $620/630 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ como referência (comprimento de onda duplo).

Controlo de qualidade

Valores de qualificação de controlo negativo (CN): A absorvância do CN deve ser maior ou igual a 0,000 e menor ou igual a 0,120. Elimine todos os valores de CN fora desse intervalo. Se dois ou mais valores forem inferiores a 0,000 ou superiores a 0,120, o ensaio é inválido e deve ser repetido. Calcule o CN médio (CNX) dos outros valores do controlo.

Qualificação dos valores de controlo positivo HTLV-I (CP-I) e HTLV-II (CP-II): A absorvância de CP-I e CP-II deve ser maior ou igual a 0,500. Se o valor de PC-I e/ou PC-II estiver abaixo da especificação, o ensaio é inválido e deve ser repetido.

Validade do teste: Um ensaio é válido se os valores do controlo positivo e negativo forem qualificados e

$$(CP-I) - CNX \geq 0,380 \quad (CP-II) - CNX \geq 0,380$$

Se os resultados não cumprirem estes critérios, a técnica pode ser suspeita; o ensaio é inválido e deve ser repetido.

RESULTADOS

Cálculos

Os cálculos devem ser realizados separadamente para cada suporte para tiras.

Ponto de corte: Se o ensaio for válido, calcule o ponto de corte como se segue:

$$\text{Ponto de corte: } CNX + 0,330$$

Uma amostra de teste é não reativa se a sua absorvância for maior ou igual a 0,000 e inferior ao ponto de corte.

Uma amostra de teste é reativa se a sua absorvância for maior ou igual ao ponto de corte.

Cálculos para a amostra

Absorvância (comprimento de onda único)

CN	=	0,065, 0,070, 0,075
CNX	=	0,070
CP-I	=	1,110
CP-II	=	1,050

Absorvância (comprimento de onda duplo)

CN	=	0,034, 0,030, 0,035
CNX	=	0,033
CP-I	=	1,073
CP-II	=	1,013

Critérios de aceitação

Elimine todos os valores de absorvância do controlo que não cumpram os seguintes critérios:

$0,000 \leq CN \leq 0,120$	Nenhum eliminado
$CP-I \geq 0,500$	Nenhum eliminado
$CP-II \geq 0,500$	Nenhum eliminado

Confirme que os seguintes dados estejam dentro dos critérios de aceitação especificados.

(Comprimento de onda único)

$$(CP-I) - CNX \geq 0,380$$
$$(CP-II) - CNX \geq 0,380$$

$1,110 - 0,070 = 1,040$	Aprovado
$1,050 - 0,070 = 0,980$	Aprovado

(Comprimento de onda duplo)

$1,073 - 0,033 = 1,040$	Aprovado
$1,013 - 0,033 = 0,980$	Aprovado

Validade do teste (comprimento de onda único)

Aprovado

Validade do teste (comprimento de onda duplo)

Aprovado

Cálculo do ponto de corte (comprimento de onda único duplo)

$$\begin{aligned} \text{Valor de corte} &= CNX + 0,330 \\ &= 0,070 + 0,330 \\ &= 0,400 \end{aligned}$$

Cálculo do ponto de corte (comprimento de onda duplo)

$$\begin{aligned} \text{Valor de corte} &= CNX + 0,330 \\ &= 0,033 + 0,330 \\ &= 0,363 \end{aligned}$$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. Amostras com valores de absorvância maiores ou iguais a 0,000 e inferiores ao ponto de corte são consideradas não reativas pelos critérios de Avioq HTLV-I/II e podem ser consideradas negativas para anticorpos para HTLV-I e HTLV-II. Um resultado negativo no teste não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por HTLV-I/II.
2. Resultados de amostras com valores de absorvância inferiores a 0,000 devem ser retestadas individualmente para confirmar o resultado inicial. Se a amostra tem valor de absorvância inferior ao ponto de corte após o novo teste, pode ser considerada negativa para anticorpos para HTLV-I e HTLV-II conforme os critérios de Avioq HTLV-I/II.
3. Amostras com valores de absorvância maiores ou iguais ao valor de corte são consideradas inicialmente reativas pelos critérios de Avioq HTLV-I/II, mas antes da interpretação a amostra deve ser testada novamente em duplicado usando o ensaio Avioq HTLV-I/II. Se um dos novos testes duplicados for reativo, a amostra é considerada repetidamente reativa para anticorpos para HTLV-I e/ou HTLV-II conforme os critérios do sistema microelisa Avioq HTLV-I/II.
4. Amostras inicialmente reativas que não reagem em nenhum dos testes repetidos em duplicado são consideradas negativas para anticorpos para HTLV-I/II.
5. Na maioria dos casos, é apropriado investigar repetidamente amostras reativas por meio de testes adicionais mais específicos (**LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**). Amostras que se mostram repetidamente reativas por ELISA e positivas por testes adicionais mais específicos são consideradas positivas para anticorpos para HTLV-I e/ou HTLV-II. A interpretação dos resultados de amostras que se mostram repetidamente reativas por ELISA e negativas ou indeterminadas em testes adicionais mais específicos não é clara. Para se obter esclarecimento adicional, pode-se testar outra amostra colhida do mesmo indivíduo três a seis meses depois.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O "PROCEDIMENTO DE TESTE" e a "Interpretação dos resultados" do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II devem ser seguidos rigorosamente ao testar a presença de anticorpos para HTLV-I e/ou HTLV-II em plasma ou soro de indivíduos. Este ensaio foi projetado e validado para uso com soro ou plasma humano de pacientes e amostras de doadores e a partir de amostras de soro ou plasma recolhido de doadores cadavéricos. Não foram estabelecidas características de desempenho para outros tipos de amostra (fluido pleural, saliva, fluido oral, eluatos de gotas de sangue seco, amostras não humanas, etc.), um pool de sangue ou plasma processado e produtos desses pools.

Não adicionar uma amostra conforme indicado no "PROCEDIMENTO DE TESTE" pode resultar num resultado falso negativo.

O sistema microelisa Avioq HTLV-I/II detecta anticorpos para HTLV-I e/ou HTLV-II no sangue e, assim, é útil para triagem de sangue doado para evitar a transmissão de HTLV-I e/ou HTLV-II para receptores de componentes celulares de sangue, e como auxiliar no diagnóstico clínico de infecção por HTLV-I ou HTLV-II e doenças relacionadas. Sabe-se que a infecção por HTLV-I adquirida pela transfusão de produtos sanguíneos infectados pode resultar em doenças nos receptores³⁶.

Diretrizes⁴⁰ publicadas pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos recomendam que amostras repetidamente reativas podem ser investigadas por testes adicionais mais específicos como Western Blot (WB) e ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA). Esses testes complementares devem ser usados além dos testes para um péptido específico ou de ensaios de sonda para distinção de HTLV-I e HTLV-II. A interpretação desses testes deve ser coerente com as diretrizes publicadas.

Presume-se que uma pessoa com soro ou plasma que reage no teste ELISA e num teste adicional mais específico esteja infetada com o vírus HTLV-I ou HTLV-II. As implicações médicas de seropositividade para HTLV-II não são conhecidas. Devem ser oferecidos orientação e avaliação médica apropriadas, de acordo com as diretrizes publicadas dos Serviços de Saúde Pública⁴⁰. Essa avaliação deve ser considerada uma parte importante dos testes de anticorpos para HTLV-I/II e deve incluir uma confirmação do resultado do teste numa amostra recém-colhida.

ATL e TSP/HAM são síndromes clínicas e o seu diagnóstico somente pode ser estabelecido clinicamente. Os testes com o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II não podem ser usados sozinhos para diagnosticar essas condições, mesmo se a investigação recomendada de amostras reativas confirmar a presença de anticorpos para HTLV-I. Um resultado negativo no teste a qualquer ponto da investigação sorológica não exclui a possibilidade de exposição ou infeção por HTLV-I ou HTLV-II. Deve-se considerar repetir o teste usando o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II quando houver suspeita clínica de infeção por HTLV-I ou HTLV-II. Resultados negativos neste ensaio para indivíduos com exposição anterior a HTLV-I e/ou HTLV-II podem dever-se a níveis de anticorpos abaixo do limite de deteção deste ensaio ou falta de reatividade aos antígenos HTLV usados neste ensaio.

Resultados falsos positivos podem ocorrer com um kit de teste deste tipo. A proporção de falsos reativos depende da prevalência de anticorpos para HTLV-I e/ou HTLV-II na população analisada e na sensibilidade e especificidade do kit de teste do fabricante utilizado.

RESULTADOS ESPERADOS

A percentagem de amostras determinadas como repetidamente reativas numa população normal de doadores difere dependendo da prevalência de anticorpos para HTLV-I ou HTLV-II naquela área geográfica. Áreas com alta prevalência de HTLV-I incluem partes da África, Micronésia, Japão, ilhas do Havai e das Caraíbas. Áreas com alta prevalência de HTLV-II incluem populações de toxicodependentes por via intravenosa (IVDA) e várias tribos de ameríndios na América do Norte e do Sul. A experiência com doadores de sangue avaliados nos Estados Unidos é mostrada na secção Especificidade. A experiência dos testes em populações com doença por HTLV-I ou com alto risco para HTLV-I ou HTLV-II é resumida nas secções Sensibilidade e Populações endémicas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ENSAIO

Reprodutibilidade

Duplicados de amostras positivas para anticorpos para HTLV-I e HTLV-II com graus variados de reatividade, amostras negativas e controlos do kit foram testados em vários locais (n=3), usando diversos lotes de kit (n=3) e diversos técnicos (n=2) em dias diferentes (n=4). A precisão total, inter-ensaio e intra-ensaio é relatada na tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Reprodutibilidade do ensaio

ID	N	Média	Total		Inter-ensaio		Intra-ensaio	
			DP	CV	DP	CV	DP	CV
HTLV-I S1	288	2,93	0,346	11,8	0,328	11,2	0,115	3,9
HTLV-I S2	288	1,95	0,246	12,6	0,231	11,8	0,090	4,6
HTLV-I S3	288	1,55	0,228	14,7	0,214	13,8	0,080	5,2
HTLV-I S4	288	1,62	0,206	12,7	0,196	12,1	0,067	4,1
HTLV-I S5	288	0,19	0,024	12,6	0,018	9,5	0,016	8,4
HTLV-II S1	288	3,13	0,348	11,1	0,331	10,6	0,113	3,6
HTLV-II S2	288	2,13	0,270	12,7	0,241	11,3	0,123	5,8
HTLV-II S3	288	2,16	0,248	11,5	0,234	10,8	0,084	3,9
HTLV-II S4	288	1,41	0,201	14,3	0,184	13,0	0,082	5,8
HTLV-II S5	288	0,18	0,029	15,9	0,020	11,1	0,021	11,7
CN	216	0,18	0,027	15,0	0,021	11,7	0,018	10,0
CP HTLV-I	72	2,69	0,338	12,6				

ID	Identificação do membro do painel
N	Número de duplicados
MÉDIA	Média da relação sinal/ponto de corte (SCR)
DP	Desvio padrão de SCR
CV	Coefficiente de variação de SCR

Especificidade

A especificidade deste ensaio foi avaliada pelo teste de 11.415 amostras normais de soro e plasma humano colhidas em vários locais. Um desmembramento dos dados, por local e tipo de amostra, é resumido na tabela 2 abaixo. Com base numa suposta prevalência zero de anticorpos para HTLV-I e HTLV-II em doadores humanos normais, a especificidade geral estimada deste ensaio foi de 99,95 (95% de limites de confiança de 99,89% a 99,98%). Cada população também tem limites de confiança de 95% para taxa de reativo repetido e especificidade estimada para cada local e tipo de amostra.

Tabela 2: Especificidade estimada em doadores aleatórios de sangue total e plasma e populações de fonte de plasma

	Número testado	Não reativo inicial	Reativo inicial	Reativo repetido	Reativo repetido (%)	Limites de confiança de 95%** para reativo repetido (%)		Positivo em teste complementar***	*Especificidade estimada (%)	Limites de confiança de 95%** para especificidade (%)	
Soro Local 1	1315	1314	1	1	0,08	0,004	0,334	0	99,92	99,58	99,99
Soro Local 2	3754	3753	1	1	0,03	0,002	0,117	0	99,97	99,85	99,99
Plasma Local 1	1255	1255	0	0	0,00	0,000	0,153	0	100,00	99,71	100,00
Plasma Local 2	3812	3809	3	3	0,08	0,020	0,204	0	99,92	99,77	99,98
Local Fonte de plasma	1279	1276	3	1	0,08	0,004	0,344	0	99,92	99,57	99,99

* =
$$\frac{(\text{número de amostras testadas} - \text{número de reativos repetidos}) \times 100}{(\text{número de amostras testadas} - \text{número de positivos confirmados})}$$

(número de amostras testadas – número de positivos confirmados)

** = Os limites de confiança para especificidade foram calculados usando método exato.

*** = Um resultado positivo nestes estudos foi definido pela presença de anticorpos para dois produtos de genes (gag, p19 e/ou p24 e env, gp46 e/ou 61/68) usando Western Blot e/ou RIPA.

Testes complementares adicionais e diferenciação de tipo para HTLV-I e HTLV-II foram realizados usando ensaios de uso em pesquisa: reatividade a péptidos recombinantes ou nativos gp46-I ou gp46-II em Western Blot, EIA para péptidos de HTLV-I e HTLV-II, IFA para HTLV-I e HTLV-II e/ou PCR (usando primers específicos para as regiões *tax* e *pol*).

Reatividade com condições médicas potencialmente interferentes

Amostras de indivíduos com condições médicas que possam causar reatividade não-específica com o ensaio foram testadas com este ensaio. As amostras testadas são apresentadas na Tabela 3 abaixo. Todas as amostras eram não reativas.

Tabela 3: Reatividade em amostras de indivíduos com condições médicas não relacionadas à infecção por HTLV-I ou HTLV-II

Categoria da amostra	Número de amostras testadas	Número de amostras inicialmente reativas
Anticorpos para citomegalovírus	10	0
Anticorpos para vírus Epstein-Barr	10	0
Anticorpos para vírus da herpes simplex	10	0
Anticorpos para HIV-1	10	0
Anticorpos para HIV-2	10	0
Antígeno de superfície do vírus da hepatite B	10	0
Anticorpos para sífilis	10	0
Anticorpos antinucleares	10	0
Múltiplas transfusões	10	0
Mulheres múltiparas	10	0
Fator reumatoide	10	0
Anticorpos para HCV	10	0
Hipergamaglobulinemia IgG	10	0
Hipergamaglobulinemia IgM	10	0
Anticorpos para toxoplasmose	10	0
Recetores de vacina contra gripe	36	0

Reatividade em amostras com substâncias potencialmente interferentes

Amostras lipémicas (n=10), hemolisadas (n=10) ou que continham bilirrubina elevada (n=10) foram testadas para reatividade não-específica neste ensaio. Todas as amostras eram não reativas. Além disso, como este ensaio incorpora uma proteína recombinante produzida em *E. coli*, uma série de 22 (vinte e duas) amostras previamente determinadas como positivas para a presença de anticorpos para *E. coli* foi testada para avaliar o potencial de reatividade cruzada no sistema de teste. Todas as amostras eram não reativas.

Sensibilidade

A sensibilidade deste ensaio foi estimada pela avaliação das amostras indicadas como seropositivas por testes complementares de uso em pesquisa (Western blot, RIPA, IFA e, em alguns casos, PCR). Essas amostras eram de populações com doenças associadas ao HTLV, populações de toxicod dependentes por via intravenosa (IVDA) e doadores de sangue infetados por HTLV. Os resultados foram listados na Tabela 4 abaixo. Este ensaio foi reativo com todas as 636 amostras positivas dos testes completos de uso em pesquisa. Este ensaio tem uma sensibilidade estimada de 100% (intervalo de 99,97% a 100%) para 636 amostras positivas de testes complementares para uso em pesquisa pela distribuição binomial com 95% de confiança.

Tabela 4: Reatividade com teste complementar para amostras positivas para anticorpos para HTLV-I, HTLV-II e HTLV-I/II

Grupo	Resultados do teste complementar ^a	Nº testado	Nº de repetidamente reativos com testes autorizados para HTLV-I	Nº de repetidamente reativos com Avioq HTLV-I/II
Leucemia de células T do adulto	HTLV-I	47	47	47
Paraparesia espástica tropical	HTLV-I	43	43	43
Linfoma nasofaríngeo	HTLV-I	1	1	1
Toxicod dependentes por via intravenosa	HTLV-I	5	5	5
	HTLV-II	95	94 ^c	95
Pacientes hospitalares ^b	HTLV-I	107	107	107
	HTLV-II	38	38	38
Doadores de sangue	HTLV-I	146	146	146
	HTLV-II	138	138	138
	HTLV-I/II	16	16	16
TOTAL		636	635	636

a Um resultado positivo nesses estudos foi definido pela presença de anticorpos para dois produtos de genes (gag, p19 e/ou p24 e env, gp46 e/ou 61/68) usando Western Blot e/ou RIPA.

Testes complementares adicionais e diferenciação de tipo para HTLV-I e HTLV-II foram realizados usando ensaios de uso em pesquisa: reatividade a péptidos recombinantes ou nativos gp46-I ou gp46-II em Western Blot, EIA para péptidos de HTLV-I e HTLV-II, IFA para HTLV-I e HTLV-II e/ou PCR (usando primers específicos para as regiões *tax* e *pol*).

b Assintomáticos e alguns sintomas indicativos de doença por HTLV.

c O teste autorizado para HTLV-I saltou um IVDA (valores de sinal/corte de 0,8, 0,9, 0,9) que ficou indeterminado por Western Blot (apenas p21) e tipificado como HTLV-II por PCR.

Populações em áreas endémicas para HTLV-I e HTLV-II

O desempenho deste ensaio foi avaliado com amostras de uma população numa área endémica para HTLV-I e duas populações em áreas endémicas para HTLV-II. Para a população da área endémica para HTLV-I, foram avaliadas 532 amostras de uma população de alta prevalência nas ilhas do Pacífico. 20 amostras dessa população foram determinadas como positivas para anticorpos para HTLV-I por métodos complementares para uso em pesquisa (Western Blot, IFA ou RIPA). Todas as 20 amostras positivas para anticorpos para HTLV-I foram repetidamente reativas neste ensaio e num ensaio autorizado para HTLV-I. 3 amostras adicionais repetidamente reativas no teste autorizado para HTLV-I foram não reativas neste ensaio. Nenhuma dessas 3 amostras apresentou resultado positivo para anticorpos para HTLV-I nos testes complementares utilizados. Os resultados desse estudo estão resumidos na tabela abaixo.

Nos estudos das áreas endémicas para HTLV-II, um total de 525 amostras foram obtidas de uma população de nativos americanos no Novo México (361) e de uma tribo amazónica, os Kaiapós, no Brasil (164). Das duas populações, 60 amostras foram determinadas como positivas para HTLV-I por testes complementares para uso em pesquisa (Western Blot, IFA, RIPA ou, em alguns casos, PCR). Das amostras, 58 foram repetidamente reativas com este ensaio. As duas amostras relatadas como não reativas por este ensaio eram da população de índios Kaiapós. Todas as amostras positivas para HTLV-II por teste complementar da população de nativos americanos foram repetidamente reativas neste ensaio. Uma amostra da população de americanos nativos foi repetidamente reativa neste ensaio, mas não foi positiva para anticorpos para HTLV-II no teste complementar (Western Blot). Os resultados desse estudo estão resumidos na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Reatividade com amostras de populações em áreas endémicas para HTLV-I e HTLV-II

Área endémica	Nº testado	Nº de positivos por testes complementares ^a	Nº de repetidamente reativos	Nº (percentagem) de positivos em testes complementares que foram repetidamente reativos em EIA
Ilhas do Pacífico (HTLV-I)	532	20b	20	20 (100%)
Novo México (HTLV-II)	361	7c	8	7 (100%)
Brasil (HTLV-II)	164	53c	51d	51 (96,2%)

a Um resultado positivo nesses estudos foi definido pela presença de anticorpos para dois produtos de genes (gag, p19 e/ou p24 e env, gp46 e/ou 61/68) usando Western Blot e/ou RIPA.

Testes complementares adicionais e diferenciação de tipo para HTLV-I e HTLV-II foram determinados usando ensaios de uso em pesquisa: reatividade a péptidos recombinantes ou nativos gp46-I ou gp46-II em Western Blot, EIA para péptidos de HTLV-I e HTLV-II, IFA para HTLV-I e HTLV-II e/ou PCR (usando primers específicos para as regiões tax e pol).

b O número de amostras positivas nos testes complementares baseou-se nos resultados dos testes de pesquisa Western Blot, IFA e RIPA para HTLV-I/HTLV-II de qualquer amostra repetidamente reativa ou que fosse inicialmente reativa numa zona cinzenta de 20% por ELISA.

c O número de amostras positivas nos testes complementares baseou-se nos resultados dos testes de pesquisa Western Blot, IFA e RIPA para HTLV-I/HTLV-II de todas as amostras (361 do Novo México e 164 do Brasil).

d As duas amostras mostraram-se indeterminadas por Western Blot, positivas para anticorpos para HTLV por RIPA, positivas para anticorpos para HTLV-II por IFA e positivas para DNA de HTLV por PCR.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ENSAIO FABRICADO EM NOVO LOCAL

O Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II é idêntico ao Sistema Microelisa Vironostika® HTLV-I/II anteriormente fabricado por bioMérieux, Inc., com uma alteração no local de fabrico. Estudos conduzidos para avaliar o desempenho do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II fabricados no novo local demonstraram que o ensaio fabricado no novo local tem reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade comparáveis aos dos kits de teste fabricados no local original.

Reprodutibilidade

Para demonstrar a reprodutibilidade do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II fabricado no novo local, um painel formado por amostras positivas para anticorpos para HTLV-I e HTLV-II com vários graus de reatividade (quatro HTLV-I e quatro HTLV-II) e duas amostras negativas foram testados com cada um dos três lotes de kit por um período de quatro dias, usando dois analistas usando o método de teste manual. Cada amostra foi testada em quadruplicado em cada um dos quatro dias. O CV total para as amostras positivas usando os três lotes de validação variou de 8,9% a 19,7% (n=96) em comparação com a variação do CV total para as amostras positivas de 11,1% a 15,9% para o ensaio fabricado no local anterior (n=288, 3 locais, 3 lotes, 2 operadores, 4 dias e testes realizados em quadruplicado).

Tabela 6: Resumo do estudo de reprodutibilidade para o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II (método manual)

				Total				Inter-ensaio		Intra-ensaio	
ID do painel	Status	N	Média de S/C	DP	%CV	S/C inferior 95% IC	S/C superior 95% IC	DP	%CV	DP	%CV
HTLV-I S1	Pos	96	3,10	0,276	8,9	3,04	3,15	0,244	7,9	0,136	4,4
HTLV-I S2	Pos	96	2,92	0,300	10,3	2,85	2,98	0,246	8,4	0,176	6,0
HTLV-I S3	Pos	96	2,50	0,312	12,5	2,44	2,56	0,259	10,4	0,180	7,2
HTLV-I S4	Pos	96	2,18	0,226	10,4	2,13	2,22	0,190	8,7	0,126	5,8
HTLV-I S5 ^a	Neg	96	0,25	0,023	9,2	0,24	0,25	0,020	8,0	0,012	4,8
HTLV-II S1	Pos	96	3,29	0,561	17,1	3,17	3,40	0,482	14,7	0,298	9,1
HTLV-II S2	Pos	96	3,15	0,569	18,1	3,03	3,26	0,537	17,1	0,210	6,7
HTLV-II S3	Pos	96	2,46	0,486	19,7	2,36	2,56	0,462	18,8	0,170	6,9
HTLV-II S4	Pos	96	2,22	0,364	16,4	2,14	2,29	0,300	13,5	0,214	9,6
HTLV-II S5 ^a	Neg	96	0,23	0,020	8,7	0,22	0,23	0,016	7,2	0,012	5,4

a Amostra negativa para anticorpos para HTLV-I e HTLV-II

Especificidade

Para demonstrar que a especificidade clínica do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II fabricado no novo local era comparável à do teste originalmente autorizado, amostras de soro (n=1.000) e plasma (n=1.000) de estatuto desconhecido de populações de baixo risco (doadores de sangue) foram testadas com três lotes de kit usando o método de teste manual. Cada lote foi usado para testar um número semelhante de amostras. Das 2.000 amostras testadas, duas foram repetidamente reativas (ver Tabela 7). Ambas as amostras apresentaram resultado negativo para IFA e Western Blot para HTLV-I e HTLV-II para uso em pesquisa. Portanto, a especificidade estimada do ensaio Avioq observada neste estudo foi de $1998/2000 = 99,90\%$ (95% IC 99,44 - 100%), em comparação com $11409/11415 = 99,95\%$ (95% IC de 99,89 - 99,98) para o ensaio fabricado no local anterior.

Tabela 7: Especificidade estimada do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II em doadores de sangue aleatórios

	Número testado	Não reativos	Repetidamente	Teste positivo complementar	Especificidade estimada (%)	Limites de confiança de 95% para especificidade (%)	
Soro	1000	999	1	0	99,90	99,44	100,00
Plasma	1000	999	1	0	99,90	99,44	100,00

Sensibilidade

Para avaliar se a sensibilidade clínica do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II fabricado no novo local era comparável à do teste originalmente autorizado, um painel de 200 amostras seropositivas de soro ou plasma (100 HTLV-I e 100 HTLV-II) foram testadas com três lotes de kit usando o método de teste manual (tabela 8). Todas as amostras foram anteriormente determinadas como repetidamente reativas num teste para triagem de doadores de sangue para HTLV-I/II autorizado pela FDA e confirmadas como positivas para anticorpos para HTLV-I/II com um teste complementar para uso em pesquisa (WB, IFA e/ou RIPA). Oitenta e sete por cento dessas amostras foram de doadores de sangue dos Estados Unidos e nenhuma foi previamente testada utilizando o ensaio original autorizado Vironostika. A sensibilidade estimada do ensaio observada neste estudo foi de $200/200 = 100\%$ (95% IC 98,17 - 100%), em comparação com $636/636 = 100\%$ (95% IC de 99,97 - 100) para o ensaio fabricado no local anterior.

Tabela 8: Reatividade do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II com amostras seropositivas para HTLV-I/II

Número testado	Número de repetidamente reativos	Número de não reativos	Sensibilidade estimada (%)	Limites de confiança de 95% para sensibilidade (%)	
200	200	0	100,00	98,17	100,00

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO SISTEMA ORTHO® SUMMIT (OSS) COM SISTEMA DE MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS ORTHO® SUMMIT (PIPETADOR SUMMIT)

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II no instrumento OSS foi realizada utilizando um painel de 10 amostras testadas em duplicado (quatro positivas para HTLV-I, quatro positivas para HTLV-II e duas negativas). O estudo foi conduzido em dois locais, num total de três instrumentos, duas vezes por dia, por quatro dias, utilizando um lote de validação do kit de ensaio, e comparado aos testes com este painel utilizando o método manual com o mesmo lote de validação. Os resultados desse estudo estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9: Estudo de reprodutibilidade para o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II em OSS (método automático)

ID do painel	Status	N	Média de S/C	Total				Inter-centro		Intra-centro	
				DP	%CV	S/C inferior 95% IC	S/C superior 95% IC	DP	%CV	DP	%CV
HTLV-I S1	Pos	96	4,54	0,375	8,3	4,47	4,62	0,305	6,7	0,226	5,0
HTLV-I S2	Pos	96	4,03	0,366	9,1	3,95	4,10	0,288	7,1	0,232	5,8
HTLV-I S3	Pos	96	3,63	0,325	8,9	3,57	3,70	0,253	7,0	0,208	5,7
HTLV-I S4	Pos	96	2,84	0,283	10,0	2,78	2,89	0,218	7,7	0,184	6,5
HTLV-I S5 ^a	Neg	96	0,26	0,052	20,3	0,25	0,27	0,045	17,5	0,028	10,8
HTLV-II S1	Pos	96	5,86	0,421	7,2	5,77	5,94	0,323	5,5	0,276	4,7
HTLV-II S2	Pos	96	5,75	0,347	6,0	5,68	5,82	0,270	4,7	0,224	3,9
HTLV-II S3	Pos	96	4,95	0,463	9,4	4,85	5,04	0,385	7,8	0,268	5,4
HTLV-II S4	Pos	96	4,22	0,332	7,9	4,16	4,29	0,277	6,6	0,189	4,5
HTLV-II S5 ^a	Neg	96	0,13	0,028	20,7	0,13	0,14	0,023	17,0	0,016	12,1

^a Amostra negativa para anticorpos para HTLV-I e HTLV-II

O estudo de reprodutibilidade demonstrou que a variabilidade total para as amostras positivas variou de 6% a 10% utilizando o método com OSS, em comparação com 8,9% a 19,7% para as amostras positivas utilizando o método manual (ver Tabela 6).

Sensibilidade analítica

Para demonstrar que a sensibilidade analítica do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II no instrumento OSS é comparável ao método manual, oito painéis de diluição (diluições seriais duplas de quatro amostras positivas para anticorpos para HTLV-I e quatro amostras positivas para anticorpos para HTLV-II até ao ponto de corte do ensaio) foram testados utilizando os métodos manual e automático. Para avaliar a correlação dos dois métodos, foi realizada uma análise de regressão de Deming. Essa análise mostrou uma alta correlação para a relação S/CO (sinal/ponto de corte) para ambos os formatos, com um coeficiente de correlação de 0,94. Para demonstrar a equivalência da relação S/CO entre os dois métodos, foi realizado um teste t emparelhado. A média geral de S/CO para o método manual foi de 3,143 (n=459) comparado a uma média geral de 4,198 (n=459) no instrumento OSS. Embora essa diferença seja estatisticamente significativa, a sensibilidade por diluições para determinar o ponto final foi comparável pelos dois métodos (ou seja, o ensaio no instrumento OSS não apresentou sensibilidade reduzida).

Sensibilidade

Um painel de 100 amostras de doadores de sangue repetidamente reativas num ensaio autorizado pela FDA foi testado usando o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II com os dois métodos (método manual e método automático no instrumento OSS). 95 (noventa e cinco) das amostras foram repetidamente reativas (100% de concordância) usando ambos os métodos de ensaio (manual e automático). 5 (cinco) das 100 amostras no painel foram não reativas utilizando o ensaio Avioq (manual e automático). Testes confirmatórios adicionais nessas cinco amostras mostraram que nenhuma era positiva num teste complementar. Deve-se notar que essas amostras foram previamente sujeitas a cinco ciclos de congelamento/descongelamento antes do teste. Os dados obtidos pela Avioq indicam que as amostras podem ser congeladas e descongeladas uma vez sem perda de reatividade.

A relação S/CO das 95 amostras detetadas pelo ensaio Avioq variou de 1,058 a 8,400 para o método manual e de 1,280 a 7,403 para o método automático no OSS; o coeficiente de correlação para a relação S/CO foi de 0,94. 29 (vinte e nove) dessas amostras foram positivas para anticorpos para HTLV-I, 46 foram positivas para anticorpos para HTLV-II num teste complementar para uso em pesquisa e 20 foram positivas para anticorpos para HTLV-I/II (não tipificados).

Especificidade clínica

O estudo foi realizado em dois locais para avaliar a especificidade do ensaio quando utilizado com o Sistema ORTHO® Summit (OSS) automático. Foram testadas um total de 16.339 amostras de soro e plasma colhidas aleatoriamente de doadores de sangue voluntários. Os resultados desses testes são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Resumo dos resultados de especificidade clínica para o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II em OSS (método automático)

	Local 1			Local 2			Todos os locais/lotes combinados
	Lote 10003	Lote 10004	Lote 10005	Lote 10003	Lote 10004	Lote 10005	
Número testado	1366	1366	1358	4160	4080	4009	16.339
Não reativos	1364	1366	1358	4157	4078	4007	16.330
Inicialmente reativos	2	0	1	3	3	2	11
Repetidamente reativos	2	0	0	3	2	2	9
Positivos confirmados	0	N/A	N/A	0	0	0	0
Total de falsos positivos	2			7			9
Total testado	4.090			12.249			16.339
Especificidade estimada	99,95%			99,94%			99,94%
95% IC	99,82%-99,99%			99,88%-99,98%			99,90%-99,97%
Especificidade geral estimada	99,95%						
95% IC	99,89% a 99,98%						

Das 16.339 amostras testadas de doadores de sangue, nove foram repetidamente reativas. Todas as nove foram classificadas como falsos positivos com base nos resultados de testes utilizando Western Blot (local 1) ou IFA (local 2) para uso em pesquisa. O intervalo de confiança para a especificidade estimada para o ensaio Avioq em todos três lotes em cada local e para todos os locais e lotes combinados coincide com a do ensaio Vironostika (95% IC: 99,89% a 99,98%). A especificidade geral estimada do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II em OSS foi de $16.330/16.339 = 99,94\%$ (95% IC: 99,90% a 99,97%) em comparação com $11.409/11.415 = 99,95\%$ (95% IC: 99,89% a 99,98%) usando o método manual.

Esses estudos demonstraram que o desempenho do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II no instrumento OSS é comparável ao obtido utilizando o método manual.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO SISTEMA ORTHO® SUMMIT (OSS) COM O PIPETADOR ORTHO VERSEIA®.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II no instrumento OSS com o pipetador ORTHO VERSEIA® foi realizada utilizando um painel de três amostras positivas para HTLV-I, duas positivas para HTLV-II e uma amostra negativa. O estudo foi conduzido em três locais num total de cinco pipetadores VERSEIA® e, para comparação, em pipetadores SUMMIT. Cada um testou seis duplicados em dois ensaios por dia, durante cinco dias não consecutivos. Os resultados desse estudo estão resumidos na Tabela 11. O estudo de reprodutibilidade demonstrou que a variabilidade total dos dois tipos de instrumento foi comparável.

Tabela 11: Estudo de reprodutibilidade para o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II em OSS

ID do painel	Pipetador SUMMIT						Pipetador VERSEIA®					
	N	Média	DP	%CV	S/C 95% IC		N	Média	DP	%CV	S/C 95% IC	
					Inferior	Superior					Inferior	Superior
A (HTLV-I)	150	2,549	0,515	20,2	2,468	2,631	150	2,602	0,503	19,3	2,524	2,680
B (HTLV-I)	150	2,623	0,480	18,3	2,548	2,699	150	2,708	0,491	18,1	2,632	2,785
C (HTLV-I)	150	1,718	0,416	24,2	1,653	1,783	149	1,869	0,448	24,0	1,798	1,939
D (HTLV-II)	150	2,802	0,562	20,1	2,713	2,891	150	2,823	0,601	21,3	2,728	2,918
E (HTLV-II)	150	1,985	0,365	18,4	1,928	2,042	150	2,114	0,421	19,9	2,049	2,180
F (Negativo)	150	0,061	0,016	26,0	0,059	0,064	149	0,060	0,016	26,6	0,058	0,063

Sensibilidade analítica

Para demonstrar que a sensibilidade analítica do Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II no OSS com pipetador VERSEIA® é comparável à do pipetador SUMMIT, dez painéis de diluição (quatro diluições com S/C (sinal/ponto de corte) entre 0,5 e 3,0 provenientes de cinco amostras positivas para anticorpos para HTLV-I e cinco para HTLV-II até o valor de corte do ensaio) foram testados utilizando ambos os instrumentos. Para avaliar a correlação dos dois métodos, foi realizada uma análise de regressão de Deming. Essa análise mostrou uma alta correlação para a relação S/CO para ambos os instrumentos, com uma inclinação de 1,00, intercepto de 0,01 e coeficiente de correlação de Pearson (r) de 1,00.

Sensibilidade

Um painel de sensibilidade composto por 104 amostras congeladas positivas para anticorpos para HTLV (52 amostras positivas para anticorpos para HTLV-I e 52 para HTLV-II) foi usado nesse estudo. Essas amostras foram geradas pela diluição de amostras positivas congeladas para criar uma combinação de amostras com reatividade de baixa a moderada. Assim, espera-se que algumas dessas amostras com valores de sinal/ponto de corte próximas a 1,000 variem de acima (positivo) a abaixo (negativo) do corte.

As amostras foram testadas em triplicado em cada um dos três locais, utilizando os pipetadores SUMMIT e VERSEIA®. Um total de 935 resultados válidos foram obtidos e utilizados para analisar os dados para cada instrumento. Das 935 observações, 98,1% (917/935) dos resultados do Summit foram reativos, contra 98,5% (921/935) do VERSEIA®. O teste de McNemar para resultados discordantes não demonstra diferença significativa entre os dois pipetadores com um valor p de 0,3438, indicando que o Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II é compatível com o pipetador VERSEIA®.

Especificidade clínica

Um total de 3.146 amostras de soro e plasma de doadores aleatórios foram testadas individualmente usando ambos os tipos de instrumento (SUMMIT e VERSEIA®) em três locais; cada um testou números semelhantes de amostras. Das 3.146 amostras testadas, 3.140 eram não reativas com os dois tipos de instrumento. Das 6 amostras restantes, 5 foram reativas com ambos os pipetadores, e uma mostrou resultados discordantes nos testes com os dois tipos de pipetador (reativa com o VERSEIA®, mas não reativa com o Summit); todas as seis amostras tiveram resultado indeterminado na análise com Western Blot. Supondo que todas as amostras eram negativas para anticorpos para HTLV, a especificidade do ensaio foi de 99,81% (95% IC: 99,59% a 99,93%) e 99,84% (95% IC: 99,63% a 99,95%) quando usados os instrumentos VERSEIA® e Summit, respectivamente (Tabela 12). A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa na especificidade para os dois tipos de instrumento (99,81% contra 99,84%).

Tabela 12: Resumo dos resultados de especificidade clínica

		Pipetador SUMMIT		Total
		Positivo	Negativo	
Pipetador VERSEIA®	Positivo	5	1	6 (0,19%)
	Negativo	0	3140	3140 (99,81%)
	Total	5 (0,16%)	3141 (99,84%)	3146 (100,00%)

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO TESTE DE AMOSTRAS CADAVERICAS

Reprodutibilidade

Foi avaliada a reprodutibilidade utilizando 20 amostras cadavéricas não reativas (10 de soro/10 de plasma) e 20 amostras de doadores vivos não reativas (10 de soro/10 de plasma). De cada fonte de doador (cadavérica ou doador vivo) foram marcadas 5 amostras de soro e 5 amostras de plasma com material de origem anti-HTLV-I ou anti-HTLV-II para uma reatividade de relação sinal/ponto de corte (S/CO) de 2.0. Cada amostra marcada foi testada uma vez em seis dias diferentes em cada um de três lotes num local. As percentagens de CV foram comparáveis entre amostras cadavéricas e de doadores vivos.

Tabela 13 – Reprodutibilidade do ensaio em amostras de plasma cadavéricas e de doadores vivos

Pré/Pós	Tipo	matriz	N	Média	Inferior 95%	Superior 95%	total_sd	total_cv	inter_sd	inter_cv	intra_sd	intra_cv
PÓS	HTLV-I	Plasma	90	2,13	2,05472	2,21510	0,383	17,9	0,324	15,2	0,215	10,1
		Soro	90	2,31	2,20140	2,41140	0,501	21,7	0,430	18,7	0,273	11,8
	HTLV-II	Plasma	90	2,09	2,00987	2,17973	0,405	19,4	0,348	16,6	0,221	10,6
		Soro	90	1,94	1,86472	2,02168	0,375	19,3	0,288	14,8	0,248	12,8
PRÉ	HTLV-I	Plasma	90	1,89	1,81144	1,96652	0,370	19,6	0,290	15,4	0,238	12,6
		Soro	90	1,97	1,89267	2,05320	0,383	19,4	0,322	16,3	0,219	11,1
	HTLV-II	Plasma	90	2,22	2,11903	2,32092	0,482	21,7	0,373	16,8	0,315	14,2
		Soro	90	1,96	1,88779	2,03181	0,344	17,5	0,280	14,3	0,208	10,6

Sensibilidade

As amostras testadas incluíam aproximadamente números iguais de amostras de soro e plasma de amostras *post-mortem* (C) (n=91; 46 de soro, 45 de plasma) e de amostras de doadores normais (N) (n=91; 45 de soro, 46 de plasma). As amostras foram previamente testadas para HTLV-I/II, tendo revelado não reatividade. As amostras foram utilizadas para preparar painéis marcados de HTLV-I e HTLV-II. Cada amostra foi dividida em duas e marcada com uma quantidade pré-determinada de soro de anticorpos positivo para anticorpos HTLV-I ou HTLV-II. A sensibilidade foi avaliada testando as amostras seropositivas para HTLV-I e HTLV-II de doadores normais e *post-mortem* com três lotes de kit HTLV-I/II em dois locais de teste. Os testes com resultado negativo pelo teste ELISA foram considerados falsos negativos. A sensibilidade e os intervalos de confiança de 95% foram calculados para as amostras *post-mortem* e de doadores normais marcadas com anticorpos positivos HTLV-I e HTLV-I, como apresentado na Tabela 14 abaixo. O sistema microelisa Avioq HTLV-I/II tem uma sensibilidade geral estimada em amostras cadavéricas marcadas de 100%, com um intervalo de confiança de 95% de 92,29% - 100,00% para soro e de 92,13 - 100% para plasma.

Tabela 14 – Reatividade relativamente a amostras marcadas de doadores normais e *post-mortem*

Local:	Número de lote	Tipo de amostra (Soro)	Número testado	Não reativo inicial	Reativo inicial	Percentagem de reativo	Limite de confiança de 95%
1	1	C	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
		N	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
	2	C	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
		N	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
	3	C	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
		N	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
2	1	C	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
		N	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
	2	C	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
		N	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
	3	C	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
		N	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
Loc	Número de lote	Tipo de amostra	Número testado	Não reativo inicial	Reativo inicial	Percentagem de reativo	Limite de confiança de 95%

al:		(Plasma)					
1	1	C	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
		N	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
	2	C	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
		N	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
	3	C	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
		N	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
2	1	C	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
		N	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
	2	C	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
		N	46	0	46	100%	92,29 – 100,00
	3	C	45	0	45	100%	92,13 – 100,00
		N	46	0	46	100%	92,29 – 100,00

Especificidade

As amostras de plasma *post-mortem* (C) (n=45) e de doadores vivos normais (N) (n=45; colhidas de uma população de baixo risco (banco de sangue)) foram cada uma testadas conforme as instruções do sistema microelisa Avioq HTLV-I/II com três lotes de kit HTLV-I/II em dois locais de teste. Foi calculada a especificidade, bem como os intervalos de confiança de 95%, para as amostras *post-mortem* e de doadores normais, como apresentado na Tabela 15 abaixo. O sistema microelisa Avioq HTLV-I/II tem uma especificidade geral estimada em amostras cadavéricas de plasma de 100%, com um intervalo de confiança de 95% de 92,13 - 100%.

Tabela 15 – Especificidade estimada em amostras de plasma aleatórias e *post-mortem*

Local :	Lote	Tipo de amostra (Plasma)	Número testado	Não reativo	Reativo repetido	Especificidade estimada (%)*	Limites de confiança de 95% para especificidade (%)**
Local 1	Lote 1	Cadavérico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normal	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lote 2	Cadavérico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normal	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lote 3	Cadavérico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normal	45	45	0	100	92,13-100,0
Local 2	Lote 1	Cadavérico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normal	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lote 2	Cadavérico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normal	45	45	0	100	92,13-100,0
	Lote 3	Cadavérico	45	45	0	100	92,13-100,0
		Normal	45	45	0	100	92,13-100,0

* = $\frac{\text{Número de amostras testadas} - \text{número de reativos repetidos}}{\text{Número de amostras testadas}} \times 100$

(Número de amostras testadas – número de positivos confirmados)

** = Os limites de confiança para especificidade foram calculados utilizando o método exato.

Foram testadas amostras de soro de 218 doadores *post-mortem* individuais conforme as instruções do sistema microelisa Avioq HTLV-I/II com um dos três lotes de kit HTLV-I/II (aproximadamente 1/3 das amostras por lote) num único local. Foi calculada a especificidade, bem com os intervalos de confiança de 95%, como apresentado na Tabela 16 abaixo. O sistema microelisa Avioq HTLV-I/II tem uma especificidade geral estimada em amostras cadavéricas de 100%, com um intervalo de confiança de 95% de 98,32 - 100%.

Tabela 16 – Especificidade estimada em amostras de soro *post-mortem*

Lote	Tipo de amostra (Soro)	Número testado***	Não reativo inicialmente	Reativo repetido	Especificidade e estimada (%)*	Limites de confiança de 95% para especificidade (%)**
Lote 1	Cadavérico	73	73	0	100	95,07-100,0
Lote 2	Cadavérico	73	73	0	100	95,07-100,0
Lote 3	Cadavérico	72	71	0	100	95,01-100,0
Total		218	217	0	100	98,32-100,0

* = $\frac{(\text{Número de amostras testadas} - \text{número de reativos repetidos})}{(\text{Número de amostras testadas} - \text{número de positivos confirmados})} \times 100$

(Número de amostras testadas – número de positivos confirmados)

** = Os limites de confiança para especificidade foram calculados utilizando o método exato.

*** = Num estudo separado, foram testadas 46 amostras de soro cadavéricas e 46 amostras de soro de doadores vivos utilizando cada uma três lotes de kit HTLV-I/II diferentes em dois locais. Uma amostra cadavérica foi repetidamente reativa em todos os três lotes de kit em ambos os locais. Uma segunda amostra cadavérica foi repetidamente reativa em todos os três lotes de kit num local e em dois lotes de kit no outro local.

Referências

1. Poiesz BJ, *et al.* Detection and Isolation of type C Retrovirus Particles from Fresh and Cultured Lymphocytes of a Patient with Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77 (12): 7415-7419.
2. Blattner WA, *et al.* Epidemiology of Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus. *J Infect Dis* 1983; 147(3): 406-416.
3. Hinuma Y, *et al.* Antibodies of Adult T-Cell Leukemia-Virus-Associated Antigen (ATLA) in Sera from Patients with ATL and Controls in Japan: A Nationwide Sero-epidemiologic Study. *Int J Cancer* 1982; 29: 631-635.
4. Tajima K, *et al.* HTLV-I Carriers Among Migrants from an ATL-Endemic Area to ATL Non-Endemic Metropolitan Areas in Japan. *Int J Cancer* 1986; 37: 383-387.
5. Mann DL, *et al.* HTLV-I associated B-cell CLL: indirect role for retrovirus in leukemogenesis. *Science* 1987; 236: 1103-6.
6. Manns A, *et al.* The epidemiology of HTLV-I and -II: etiologic role in human disease. *Transfusion* 1991; 31(1): 67-75.

7. D'Aquila RT: Newly recognized human viruses. *Mediguide to Inf. Diseases* 1993; 12(4): 2-6.
8. Manns A, *et al.* Role of HTLV-I in development of NHL in Jamaica and Trinidad and Tobago. *The Lancet* 1993; 342: 1447-50.
9. Morgan OS, *et al.* HTLV-I and polymyositis in Jamaica. *Lancet*, 1989; 2:1184-87.
10. Sato K, *et al.* Arthritis in patients infected with HTLV-I. *Arthritis and Rheumatism* 1991; 34(6): 714-21.
11. Sato K, *et al.* HTLV-I and Arthritis. *Rheumatol. Rev.* 1992; 1: 185-92.
12. Zucker-Franklin, *et al.* KS in a HIV negative patient with asymptomatic HTLV-I infection: *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 987-89.
13. Mochizuki M, *et al.* Uveitis associated with HTLV-I: seroepidemiologic, clinical and virologic studies. *J. Inf. Diseases* 1992; 166: 943-46.
14. Zucker-Franklin D, *et al.* Human Lymphotropic Retroviruses Associated With Mycosis Fungoides: Evidence That Human T-Cell Lymphotropic Virus Type II (HTLV-II) as Well as HTLV-I May Play a Role in the Disease. *Blood* 1992; 80(6): 1537-45.
15. Bazarbachi A, *et al.* HTLV-I provirus and mycosis fungoides. *Science* 1993; 259: 1470-71.
16. Clark J, *et al.* Seroepidemiologic Studies of Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus Type I in Jamaica. *Int J Cancer* 1985; 36: 37-41.
17. Manzari V, *et al.* HTLV-I is Endemic in Southern Italy: Detection of the First Infectious Cluster in a White Population. *Int J Cancer* 1985; 36: 557-559.
18. Blayney DW, *et al.* The Human T-Cell Leukemia-Lymphoma Virus in the Southeastern United States. *JAMA* 1983; 250(8): 1048-1052.
19. Botha MC, *et al.* Distribution and Possible Spread of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Human Communities in the Northern and Eastern Transvaal. *South African Med J* 1985; 67: 668-671.
20. Wong-Staal F and Gallo RC: Human T-lymphotropic Retroviruses. *Nature* 1985; 317: 395-403.
21. Yoshida M: Human Leukemia Virus Associated with Adult T-Cell Leukemia. *Gann* 1983; 74: 777-789.
22. Levine P, *et al.* HTLV-II infection in Florida Indians. *Aids Res. and Human Retroviruses* 1993; 9(2): 123-27.
23. Hjelle B, *et al.* Endemic HTLV-II infection in southwestern US Indians involves two prototype variants of virus. *J. Infect. Diseases* 1993; 168: 737-40.
24. Lal RB, *et al.* Sequence variation within the immunodominant epitope-coding region from external glycoprotein of HTLV-II in isolates from Seminole Indians. *J. Infect. Diseases* 1994; 169: 407-11.
25. Maloney EM, *et al.* Endemic HTLV-II infection among isolated Brazilian Amerindians. *J. Infect. Diseases* 1992; 166: 100-107.
26. Lee H, *et al.* High rate of HTLV-II infection in seropositive drug abusers in New Orleans. *Science*, 1989; 244: 471-5.
27. DeRossi A, *et al.* Serological and molecular evidence of infection by HTLV-II in Italian drug addicts by use of synthetic peptides and PCR. *Eur. J. Cancer* 1991; 27: 835-8.
28. Zella D, *et al.* Molecular characterization of two isolates from HTLV-II from Italian drug abusers and comparison of genome structure with other isolates. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 437-44.
29. Loughran TP, *et al.* Detection of HTLV-II in a patient with LGL. *Blood* 1992; 80(5): 1116-19.

30. Sohn CC, *et al.* Leukopenic chronic T-cell leukemia: association with human retroviruses. *Blood* 1986; 67(4): 949-56.
31. Cervantes J, *et al.* T-Prolymphocytic Leukemia associated with HTLV-II. *Clin. Res.* 1986; (2): 454.
32. Hjelle B, *et al.* Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *The Lancet* 1992; 339: 645-46.
33. Jacobson S, *et al.* Isolation of HTLV-II from a patient with chronic, progressive neurological disease clinically indistinguishable from HAM/TSP. *Ann. Neurol.* 1993; 33(4): 392.
34. Murphy EL, *et al.* HTLV-II associated myelopathy in 43-year-old woman. *The Lancet* 1993; 341: 757-58.
35. Harrington WJ, *et al.* Spastic Ataxia associated with HTLV-II infection. *Annals of Neurology* 1993; 33(4): 411-15.
36. Kaplan JE, *et al.* United States: Epidemiologic and Molecular Evidence Linking Donor and Recipient. *Neurology* 1991; 41 (2): 192-197.
37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guidelines*. NCCLS Document GPS-A. Villanova, PA: NCCLS, 1993.
38. U.S. Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Publication No. EPA / 530-5w-86-014, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1986.
39. The U.S. Pharmacopeia 23 / National Formulary 18: 1995; Purified Water: pg. 1637 and 1984.
40. Centers for Disease Control, U.S. Public Health Service Working Group. Guidelines for counseling persons infected with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) and type II (HTLV-II). *Ann. Intern. Med.* 118(6):448-454, 1993.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory*. Approved Guidelines – Third Edition. Villanova, PA: October 1997, NCCLS C3-A3: Vol. 17 No. 18.

DISPONIBILIDADE

Avioq Inc.

Sistema Microelisa Avioq HTLV-I/II

192 kits de teste



Número de produto 500192

576 kits de teste



Número de produto 500576

9.600 kits de teste



Número de produto 509600

Tampão de lavagem, frasco de 100 ml



Número de produto 559879

Tampão de lavagem, 4 x frasco de 100 ml



Número de produto 559880

Para assistência técnica nos Estados Unidos, entre em contacto com o Serviço ao Cliente Avioq pelo telefone 1-919-314-5535.

Para assistência técnica fora dos EUA, entre em contato com a Emergo Europe: (31)(0)70345-8570

EnzAbody é uma marca comercial registada da bioMérieux nos EUA e em outros países.



Avioq, Inc.
76 TW Alexander Drive
PO Box 12808
Research Triangle Park, North Carolina 27709
www.Avioq.com



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT, Arnhem
The Netherlands

Nº de registo: 1856 (EUA)

Dezembro de 2022

CE 2797