



ImmunoComb® II

HTLV I&II



Código: 60482005

Formato: 12 pruebas

Para uso diagnóstico in vitro solamente

Uso Previsto

El kit ImmunoComb® II HTLV I&II es una prueba rápida para la detección cualitativa de los anticuerpos IgG contra el HTLV I y HTLV II presentes en suero o plasma humano. Un total de doce pruebas pueden ser realizadas con un kit.

Introducción

Los virus linfotrópicos humanos de células T tipo I (HTLV-I) y tipo II (HTLV-II) son miembros de retrovirus humanos tipo C. El HTLV-I ha sido asociado principalmente con dos enfermedades: leucemia adulta de células T / Linfoma (ATL) y mielopatía asociada a HTLV-I / paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). El HTLV-II no ha sido etiológicamente ligada a ninguna enfermedad, aunque hay algunas evidencias de su relación en algunos desórdenes hematológicos y neurológicos. La mayoría de personas infectadas son asintomáticas, y un período de latencia, antes de la aparición de los síntomas puede suceder por muchos años. La infección por HTLV está distribuida alrededor del mundo, sin embargo se conoce que el HTLV I es altamente endémico principalmente en Japón, El Caribe, Centro y Sur América, Melanesia y África Ecuatorial. El HTLV II tiene alta prevalencia entre drogadictos intravenosos en Estados Unidos, Europa y ciertas tribus nativas americanas en Norte, Centro y Sur América. La vía de infección de HTLV I puede ser por transfusión sanguínea, transmisión trasplacentar y a través de la leche materna. La transmisión del HTLV II aparece como en el HTLV I por transfusión sanguínea, por contacto sexual y por compartir agujas y jeringas contaminadas entre drogadictos intravenosos. El virus está asociado a la célula, y así, la infección aparece seguida de una transfusión de componentes celulares de la sangre. La infección es de por vida, y una vez un individuo asintomático tiene los anticuerpos anti HTLV, él probablemente está infectado y no debe donar sangre. Por lo tanto, la importancia del tamizaje es evidente. El genoma del HTLV contiene cuatro genes principales: gag, el cual codifica las proteínas del core, (p19 y p24); env, el cual codifica glicoproteínas de envoltura (gp21, gp46); pol, el cual codifica la transcriptasa reversa (96,000 daltons); y tax, el cual codifica una proteína transactivadora de 40,000 daltons (p40x). La detección específica de HTLV está basada en las proteínas del env y del core. Estos antígenos pueden ser usados en pruebas de diagnóstico serológico en tres formas: Lisado viral total, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos. Algunas pruebas utilizan diferentes combinaciones de estas formas. El algoritmo para el diagnóstico serológico de HTLV considera un tamizaje, seguido por varias pruebas de confirmación

y discriminación. Solo las muestras, que repetidamente son reactivas por una prueba de tamizaje, están sujetas a realizarles una prueba de confirmación. Mientras que las pruebas de tamizaje son principalmente ensayos inmunoenzimáticos (EIA), las pruebas de confirmación son Western blot- o Radio-immuno-precipitación (RIPA). La tecnología de PCR puede ser usada para completar el soporte de confirmación de resultados.

Principio de la Prueba

La prueba ImmunoComb® II HTLV I&II es un ensayo inmunoenzimático indirecto de fase sólida (EIA). La fase sólida es un peine con 12 proyecciones ("dientes"). Cada diente está sensibilizado en dos puntos:

Punto superior — anticuerpos inmunoglobulina humana (Control Interno)
Punto inferior — Proteínas recombinantes HTLV I y II.

La bandeja de desarrollo tiene 6 filas (A-F) de 12 pocillos, cada fila contiene una solución reactiva lista para ser usada en cada etapa del ensayo. La prueba es realizada en etapas, pasando el peine de una fila a otra, con un período de incubación en cada etapa.

Para comenzar la prueba, se agregan muestras de suero o plasma al diluyente en los pocillos de la fila A de la bandeja de desarrollo. Luego se inserta el peine en los pocillos de la fila A. Los anticuerpos Anti-HTLV, si están presentes en la muestra, se unirán específicamente a las proteínas recombinantes en el punto inferior sobre los dientes del peine (Figura 1). Simultáneamente, inmunoglobulinas presentes en la muestra serán capturadas por los anticuerpos inmunoglobulina humana en el punto superior (Control interno). Los componentes no unidos son eliminados con un lavado en la fila B. En la fila C, Las inmunoglobulinas específicas capturadas sobre el diente reaccionarán con anticuerpos anti-IgG humano marcados con fosfatasa alcalina (FA). En las dos filas siguientes, los componentes no unidos son eliminados mediante un lavado. En la fila F, la Fosfatasa Alcalina unida reaccionará con componentes cromogénicos. Los resultados son visibles como puntos de color azul grisáceo en la superficie del diente del peine.

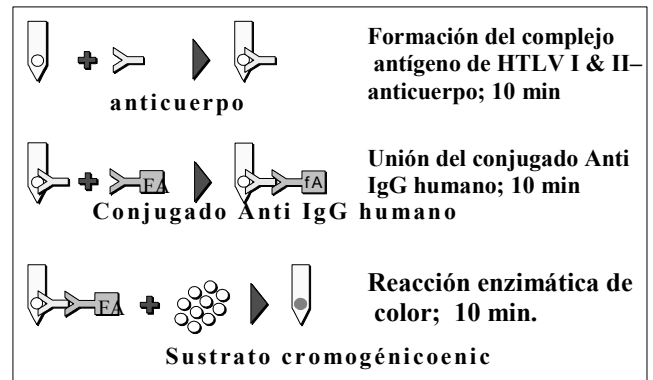


Figura 1. Principio de la Prueba

El kit incluye un control positivo (contiene anticuerpos anti HTLV I y II) y un control negativo, que deben incluirse cada vez que se realiza la prueba. Al término de esta, el diente usado con el Control Positivo debe mostrar dos puntos azul grisáceo y el diente usado con el control negativo debe mostrar solamente el punto superior. El punto superior debe también aparecer en los demás dientes, para confirmar que el kit funciona apropiadamente y que la prueba fue realizada correctamente.

Contenido del Kit

Peine

El kit contiene 1 peine plástico. El peine tiene 12 dientes, un diente para cada prueba (Figura 2). Cada diente está sensibilizado en dos áreas reactivas:

Punto superior — Anticuerpos inmunoglobulina humana (Control Interno)

Punto Inferior — Antígenos recombinantes de HTLV I&II

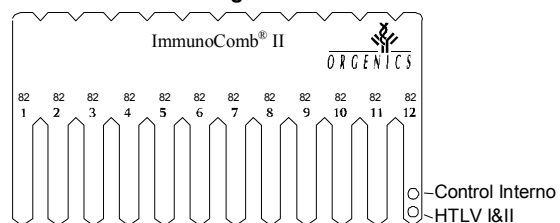


Figura 2. Peine

El peine es suministrado en empaque de aluminio que contiene una bolsa desecante.

Bandeja de Desarrollo

El kit contiene 1 bandeja de Desarrollo, cubierta con papel de aluminio. La bandeja de Desarrollo (Figura 3) contiene todos los reactivos necesarios para la prueba. La Bandeja de Desarrollo tiene 6 filas (A–F) de 12 pocillos cada una. Los contenidos de cada fila son los siguientes:

- Fila A Diluyente de la muestra
- Fila B Solución de lavado
- Fila C Anticuerpos de cabra anti-IgG humano marcados con fosfatasa alcalina
- Fila D Solución de Lavado
- Fila E Solución de Lavado
- Fila F Solución de sustrato cromogénico que contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul tetrazolio (NBT)

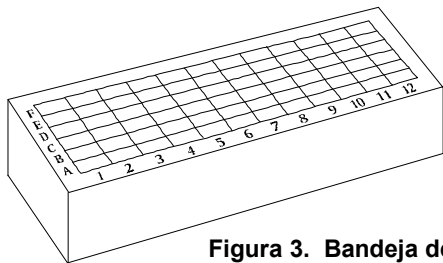


Figura 3. Bandeja de Desarrollo

Control Positivo — 1 frasco (tapa roja) de 0.2 ml de plasma humano diluido, positivo para anticuerpos anti HTLV I&II, inactivado por adición de β -propiolactona y por tratamiento por calor.

Control Negativo — 1 frasco (tapa verde) de 0.2 ml plasma humano diluido, inactivado con calor, negativo para anticuerpos anti HTLV I & II

Perforador — Para perforar el papel aluminio que cubre los pocillos de la Bandeja de Desarrollo.

Seguridad y Precauciones

- Este kit debe ser usado para diagnóstico in vitro únicamente.
- El Control Positivo debe ser manejado como si fuera potencialmente infeccioso, aunque haya sido inactivado.
- Todos los otros materiales de origen humano utilizados en la preparación de los controles pasaron pruebas que demostraron que no son reactivos al antígeno de superficie de hepatitis B y a anticuerpos contra virus de hepatitis C y al VIH. Debido a que ningún método puede brindar seguridad absoluta acerca de la ausencia de contaminación viral, todas las soluciones de referencia y todas las muestras humanas deben ser manejadas como si fueran potencialmente infecciosas.
- Use guantes quirúrgicos y ropa de laboratorio. Siga los procedimientos de laboratorio aceptados para el trabajo con suero o plasma humano.
- No pipetee con la boca.
- Deseche todas las muestras, los Peines* y otros materiales utilizados con el kit como residuos biocontaminantes.
- No mezcle reactivos de lotes diferentes.
- No utilice el kit luego de su fecha de expiración.

Conservación y estabilidad del kit

- El kit es enviado a 2-8° C. Durante el transporte el kit puede ser conservado a menos de 30° C durante cortos períodos de tiempo que no excedan de 48 horas. Los controles internos indican que el kit no ha sido dañado durante el transporte.
- Conservar el kit en su caja original a 2-8° C.
- No congelar el kit.
- Después de abrir el kit inicialmente, los componentes deben ser conservados a 2-8° C.
- El funcionamiento del kit después de su apertura inicial, es estable hasta la fecha de caducidad del mismo si se conserva a 2-8° C.
- Después del uso inicial, el peine y la bandeja de reactivos no pueden ser utilizados más de tres veces.

Manejo de las Muestras

- Es posible usar suero o plasma en la prueba.
- Las muestras pueden ser almacenadas por 7 días a temperaturas de 2° a 8°C antes de la prueba. Para almacenar las muestras por más de 7 días, congélelas a -20°C o a temperaturas más bajas.

*Excepto cuando sean almacenados para consulta posterior.

- Después de descongelar las muestras de suero, centrifúguelas. Use el sobrenadante para la prueba. Evite congelar y descongelar repetidamente.
- Los anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato sódico no han mostrado tener efecto sobre los resultados del test.

Procedimiento de la Prueba

Equipo necesario

- Pipeta de precisión con puntas descartables y capacidad de 10 μ l
- Tijeras
- Cronómetro o reloj de laboratorio.

Preparación de la Prueba

Todos los componentes deben estar a temperatura ambiente, incluyendo las Bandejas de desarrollo, los peines, los reactivos muestras; la prueba debe ser realizada a temperatura ambiente (22°-26°C).

Preparación de la Bandeja de desarrollo

1. Coloque la Bandeja de desarrollo en una incubadora a 37°C durante 20 minutos o déjela a temperatura ambiente (22°-26°C) durante 3 horas.
2. Cubra la mesa de trabajo con un papel absorbente que será descartado como desecho biocontaminante al finalizar la prueba.
3. Mezcle los reactivos agitando la Bandeja de desarrollo.

Nota: No quite la cubierta de aluminio de la Bandeja de desarrollo.

Rompa el papel de aluminio utilizando el perforador, solamente cuando las instrucciones de la prueba así lo indiquen.

Preparación del Peine

Precaución: Para asegurar el correcto funcionamiento de la prueba, **NO toque** los dientes del Peine.

1. Abra el empaque de aluminio del Peine por el borde perforado. Retire el peine.
2. Podrá utilizar el Peine y la Bandeja de desarrollo en su totalidad o solo una parte. Para utilizar parte del Peine:
 - a. Determine el número de dientes que necesitará para examinar las muestras y controles. Requerirá de un diente por cada prueba. Cada diente muestra el número de código "82" del kit, para permitir la identificación de los dientes sueltos.
 - b. Doble el Peine y pártalo en forma vertical o córtelo con las tijeras (vea Figura 4) para separar el número de dientes requerido. (Nro. de pruebas incluyendo 2 controles).
 - c. La parte del Peine no utilizada guárdela en el empaque de aluminio (con la bolsa desecante). **Cierre bien el empaque**, con un clip por ejemplo, para mantenerlo seco. Almacene el Peine en su caja original bajo temperatura de 2°-8°C, para su uso posterior.

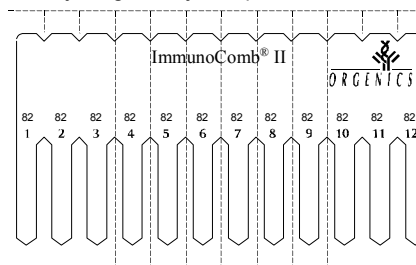


Figura 4. Fraccionamiento del Peine

Instrucciones de la prueba

Reacción Antígeno-Anticuerpo (Fila A de la Bandeja de desarrollo)

1. Tome 10 μ l de muestra con la pipeta. Perfore el papel de aluminio de uno de los pocillos de la fila A de la Bandeja de desarrollo con la punta de la pipeta o con el perforador; vierta la muestra en el fondo del pocillo. **Mezcle** la prueba vigorosamente vaciando y rellenando repetidamente la solución. Deseche la punta de la pipeta.
2. Repita el paso número 1 para las otras muestras, incluyendo un Control positivo y un Control negativo suministrados con el kit. Use un nuevo pocillo en la fila A y cambie las puntas de la pipeta para cada muestra o control.
3. a. Inserte el Peine (con la cara impresa hacia Ud.) dentro de los pocillos de la fila A que contiene muestras y controles.

Mezcle: Retire e inserte el Peine dentro de los pocillos varias veces.

b. Deje el Peine en la Fila A durante 10 minutos exactamente. Active el cronómetro. Mezcle dos veces más durante la incubación. Un poco antes de finalizar los 10 minutos, perfore el papel de aluminio de la fila B utilizando el Perforador. No abra más pocillos de los necesarios.

c. Al cumplirse los 10 minutos, saque el Peine de la Fila A. **Absorba el líquido adherido a las puntas** de los dientes apoyándolos sobre un papel absorbente limpio. No toque la superficie frontal de los dientes.

Primer lavado (Fila B)
4. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila B. **Agite:** Inserte y retire el Peine vigorosamente en los pocillos durante 10 segundos por lo menos para obtener un lavado adecuado. Repita esta acción varias veces durante el transcurso de 2 minutos; mientras tanto, perfore el papel de

aluminio de la fila C. Al cabo de 2 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido** como en el paso 3c.

Reacción con el conjugado (Fila C)

5. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila C. **Mezcle** los Peines varias veces. Programe el cronómetro 10 minutos. **Mezcle** como en el paso 3b. Perfore el papel de aluminio de la fila D. Al cabo de 10 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

Segundo lavado (Fila D)

6. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila D. Agite en forma repetida durante 2 minutos, como en el paso 4. Mientras tanto, perfore el papel de aluminio de la fila E. Al cabo de 2 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

Tercer lavado (Fila E)

7. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila E. Agite en forma repetida durante 2 minutos. Mientras tanto, perfore el papel de aluminio de la fila F. Al cabo de 2 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

Reacción de color (Fila F)

8. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila F. **Mezcle** como en el paso 3a. Programe el cronómetro 10 minutos. **Mezcle** como en el paso 3b. Al cabo de 10 minutos, retire el Peine.

Detención de la Reacción (Fila E)

9. Inserte el Peine nuevamente en la fila E. Al cabo de 1 minuto, retírelo y déjelo secar al aire.

Eliminación de residuos

Deseche las Bandejas de desarrollo, las puntas de las pipetas, el papel absorbente y los guantes como residuos biocontaminantes.

Almacenamiento de partes no usadas del kit

Bandeja de desarrollo

Si no ha usado todos los pocillos de la Bandeja de Desarrollo, podrá guardarlos para uso posterior:

- Cierre los pocillos usados con cinta adhesiva ancha, de manera que no se vierta nada, incluso si la Bandeja de desarrollo es invertida.

Otros materiales del kit

- Regrese la(s) Bandeja(s) de desarrollo, el/los Peine(s), el perforador, los controles y las instrucciones al empaque original de la caja. Almacénelos bajo temperatura de 2°– 8°C.

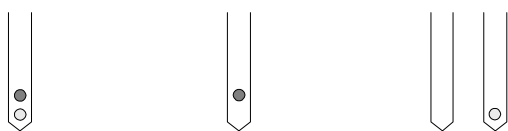
Resultados de la Prueba

Validación

Para confirmar que la prueba funciona en forma correcta y demostrar que los resultados son válidos, deberán cumplirse las siguientes tres condiciones (véase Figura 5):

1. El **Control Positivo** debe producir **dos puntos** en el diente del Peine.
2. El **Control Negativo** debe producir un punto **superior** (Control Interno) y no otros puntos.
3. **Cada muestra analizada** debe producir un punto **superior** (Control Interno).

Si alguna de estas tres condiciones no se cumple, los resultados de la prueba no son válidos y tanto las muestras como los controles deberán ser examinados nuevamente.



Control Positivo

Control Negativo

Resultado No válido

Figura 5. Validación de la prueba

Interpretación de los resultados

- La sola aparición del punto **superior** (Control Interno) indica que la muestra no es reactiva a los anticuerpos contra HTLV I & II (Figura 6a).
- Un punto circular **inferior** indica la presencia de anticuerpos contra HTLV I & II (Figura 6b).



a) Resultado negativo

b) Anticuerpos anti HTLV I & II

Figura 6. Resultados de la Prueba

Documentación de los resultados

La estabilidad del color formado en el Peine permite que los mismos puedan ser guardados para documentación posterior.

Limitaciones

En forma similar a otras pruebas destinadas a uso diagnóstico *in vitro*, los resultados de esta prueba deben ser evaluados en relación a todos los síntomas, a la historia clínica y a otros hallazgos de laboratorio relacionados con el paciente.

Características de desempeño*

Evaluaciones clínicas realizadas en Israel, Colombia y Jamaica, muestran valores altos de sensibilidad (100%) y especificidad (97%) comparados con otros kits de EIA comercialmente disponibles.

Los resultados se muestran a continuación:

Sensibilidad del kit ImmunoComb® II HTLV I&II

Tipo	No.	ImmunoComb® HTLV I&II	
		Negativo	Positivo
HTLV I	111	0	111
HTLV II	50	0	50
HTLV I&II (tipo no conocido)	93	0	93
Total	254	0	254

Especificidad del kit ImmunoComb® II HTLV I&II

Grupo	No.	ImmunoComb® HTLV I&II		Especificidad %
		Negativo	Positivo	
Donantes de sangre sanos. Area de baja prevalencia	100	98	2	98
Donantes de sangre sanos. Area de alta prevalencia	102	102	-	100
Pacientes con Cáncer	206	195	11	94.6
Enfermedades autoinmunes	15	15	-	100
Grupos de alto Riesgo (drogadictos, etc)	65	62	3	95.3
Otras enfermedades infecciosas (HIV, HAV, HBV, CMV, EBV)	36	36	-	100
Sospecha de HTLV con serología negativa	13	13	-	100
Total	537	521	16	97

CONCLUSIONES:

1. El ImmunoComb® II HTLV I&II detectó todas las muestras positivas probadas.
2. Todas las muestras definidas como negativas dieron también negativas con ImmunoComb II HTLV I&II.
3. El ImmunoComb® II HTLV I&II suministra resultados confiables tanto para HTLV- I como para HTLV- II.
4. Los resultados de ImmunoComb® II HTLV I&II son confiables en muestras que contienen potencialmente reacción cruzada con VIH y otros anticuerpos como también en otras condiciones patológicas.
5. La confiabilidad de ImmunoComb® II HTLV I&II fue demostrada en áreas de baja como de alta prevalencia, demostrando su uso apropiado en diferentes areas del mundo.

* Datos detallados disponibles

Bibliografía

Gessain A, Mahieux R. 2000. A virus called HTLV-1. Virological and molecular aspects. Presse Med. 23;29(40):2228-32.


Casseb J, Penalva-de-Oliveira AC. . 2000. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. Braz J Med Biol Res; 33(12):1395-401.

Courouce AM, Pilonel J, Saura C. 1999. Screening of blood donations for HTLV-I/II. Transfus Med Rev.; 13(4):267-74.







Manns A, Hisada M, La Grenade L. 1999. Human T-lymphotropic virus type I infection. Lancet. 5;353(9168):1951-8.

Center for Control and Prevention and the USPHS Working Group. 1993. Guidelines for counseling persons with Human T-lymphotropic virus type I (HTLV I) and type II (HTLV II). Ann Intern Med. 118:448-454.

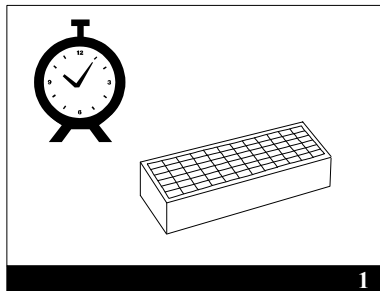
Fischer H. E. 1994. Human T-lymphotropic Virus Types I and II: Screening and Seroprevalence in Blood Donors. Current Issues in Transfusion Medicine 3(4). October-December 1994.

<p>Fabricante</p>  <p>ORGENICS</p> <p>P.O.Box 360 Yavne 70650, Israel Tel: 972-8-9429201 Fax: 972-8-9438758</p>	<p>Representante autorizado en UE</p> <p>PBS-Organics 19, rue Lambrechts-BP41 92404 Courbevoie Cedex, France Tel: 01 41 99 92 92 Fax: 01 41 99 92 95</p> <p>Version: 482/MS4 (10/2004)</p>
--	--

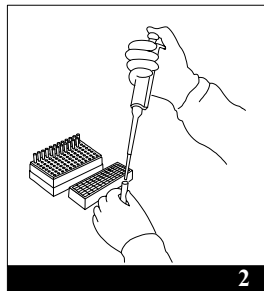
Leyenda de los símbolos

CARD	ImmunoComb® tarjeta
PLATE	Bandejas de Desarrollo
CONTROL +	Control positivo
CONTROL -	Control negativo
PERFORATOR	Perforador
	Consulte las instrucciones de uso
	Atención, ver instrucciones de uso
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura
	Contenido suficiente para 12 ensayos
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea
REF	Número de catálogo
LOT	Código de lote
	Fecha de caducidad
SN	Número de serie

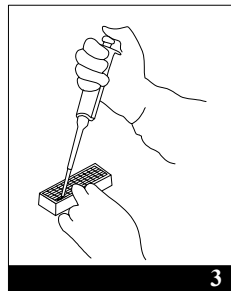
Resumen de los Principales procedimientos de la prueba



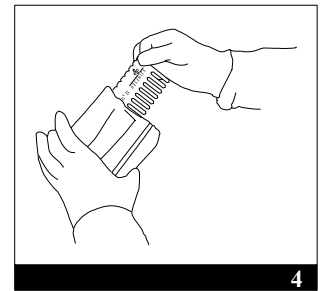
1
Preincubación de la Bandeja de Desarrollo: 3 hrs. a temperatura ambiente, ó 20 min. a 37°C



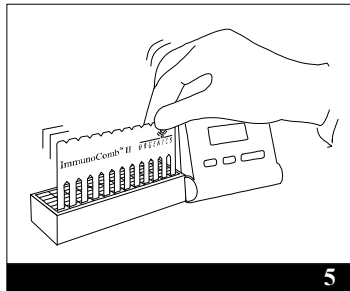
2
Tomar las muestras y controles



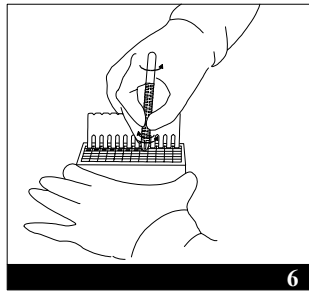
3
Agregar muestras y controles a la fila A. mezclar



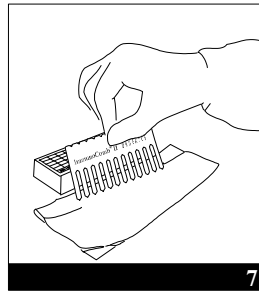
4
Sacar el peine del empaque



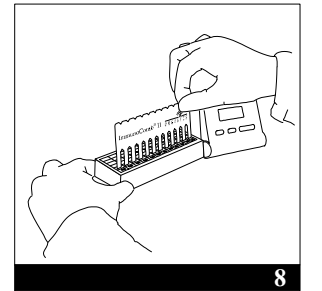
5
Insertar el peine y mezclar en la fila A. Incubar



6
Abrir la fila B

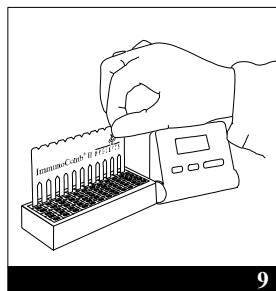


7
Absorber el líquido adherido a los dientes

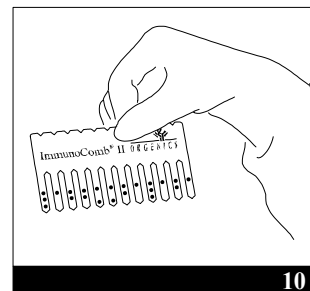


8
Insertar el peine y agitar en la fila B. Incubar

Después de mezclar / agitar e incubar en las filas C, D y E...



9
Reacción de color en la fila F



10
Resultados

Resumen del procedimiento de la Prueba

Las instrucciones abreviadas a continuación son para personas experimentadas en el uso de ImmunoComb® II

HTLV I&II Test Kit.

(Para instrucciones detalladas favor remitirse al texto completo)

1. Ponga todos los componentes, bandejas de desarrollo, peines, reactivos y muestras a temperatura ambiente y realice la prueba a temperatura ambiente (22°-26°C).
2. Vierta 10 µl de cada muestra y control en pocillos separados de la fila A de la Bandeja de Desarrollo y mezcle.
3. Inserte el peine en la fila A y continúe como se describe en la Tabla 1:

Tabla 1. Resumen del Procedimiento de la Prueba

Etapa	Fila	Procedimiento a seguir
Reacción antígeno-anticuerpo	A	Mezcle; incube 10 minutos; absorba.
Lavado	B	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Unión del conjugado	C	Mezcle; incube 10 minutos; absorba.
Lavado	D	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Lavado	E	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Reacción de Color	F	Mezcle; incube 10 minutos.
Detención de la reacción	E	Incube 1 minuto; seque al aire.

