

INSTRUÇÃO DE USO

GOLD ELISA HTLV-I/II

Código REM: 02OR1225K2

REF

IVD



INTENÇÃO DE USO

O kit Gold Elisa HTLV-I/II é um ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizado para a detecção qualitativa de anticorpos contra os vírus linfotrópico de linfócitos T humanos tipos I e/ou II (HTLV-I e HTLV-II) em soro ou plasma humano. É indicado como teste de triagem e como auxiliar no diagnóstico de potencial infecção por HTLV-I e/ou HTLV-II.

INTRODUÇÃO

Os vírus linfotrópicos de linfócitos T humanos I e II (HTLV-I e HTLV-II) são retrovírus humanos, cuja transmissão pode se dar por contato sexual, transfusão de hemocomponentes celulares, compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas, ou através de uma mãe infectada para o seu filho durante o período pré-natal ou através do aleitamento (1-5,7-9, 13, 14).

Embora a maior parte dos indivíduos infectados por HTLV-I ou HTLV-II permaneça assintomática por toda a vida, o HTLV-I foi etiológicamente associado à leucemia de linfócitos T do adulto (ATL) e a várias doenças neurológicas desmielinizantes incluindo a paraparesia espástica tropical (TSP) ou mielopatia associada ao HTLV-I (HAM), além de síndromes inflamatórias tais como uveítes, polimiosite, artropatias, síndrome de Sjögren e dermatopatias como a dermatite infecciosa e a ictiose adquirida (1, 3-8, 15). Já o HTLV-II foi associado a doenças linfoproliferativas raras como, por exemplo, leucemia de linfócitos T pilosos, e doenças neurodegenerativas, embora o seu papel etiológico não se encontre completamente estabelecido.

O vírus HTLV-I tem sido encontrado entre usuários de drogas endovenosas e apresenta distribuição geográfica esparsa, com soroprevalências mais elevadas em populações das ilhas do sul do Japão, região sudeste dos Estados Unidos, ilhas do Caribe, em algumas áreas da África, América Central e do Sul (1-3, 5-8, 12).

O vírus HTLV-II tem sido encontrado entre usuários de drogas endovenosas, doadores de sangue, e pacientes que frequentam estabelecimentos de saúde destinados ao tratamento de doenças sexualmente transmissíveis nos Estados Unidos, países europeus e América do Sul.

Devido os genomas provirais de HTLV-I e HTLV-II apresentarem homologia genética de cerca de 65%, o kit GOLD ELISA HTLV I/II utiliza antígenos recombinantes de ambos os vírus. A reatividade sorológica cruzada entre estes vírus pode ser observada em muitos casos.

O kit GOLD ELISA HTLV I/II é um ensaio imunoenzimático (ELISA) que utiliza microcavidades revestidas com uma combinação de antígenos recombinantes de HTLV-I e HTLV-II como fase sólida. A tecnologia ELISA utiliza o princípio de que antígenos ou anticorpos que fiquem ligados a fase sólida podem ser detectados por um anticorpo ou antígeno complementar que é marcado com uma enzima capaz de reagir com um substrato cromogênico. Quando o substrato cromogênico é aplicado, a presença do antígeno ou anticorpo pode ser detectada pelo desenvolvimento de um produto final colorido. Imunoensaios deste tipo foram desenvolvidos primeiramente no início de 1970. A partir desta data, a tecnologia ELISA tem sido amplamente utilizada para a detecção de antígenos e anticorpos de várias doenças infecciosas.

O kit GOLD ELISA HTLV I/II foi desenvolvido utilizando o método sanduíche (antígeno - anticorpo - antígeno conjugado), que permite detectar anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II para propósitos de diagnóstico e triagem sanguínea.

Qualquer amostra que se apresentar reagente em um teste inicial (inicialmente reagente:IR) com o kit GOLD ELISA HTLV-I/II, deve ser repetida em duplicata. A reatividade em qualquer duplicata é altamente preditiva para a presença de anticorpo em indivíduos com elevado risco de infecção, (repetidamente reagente:RR). Amostras repetidamente reagentes (RR) devem conter anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II. No entanto, testes adicionais mais específicos ou suplementares para anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II, como imunofluorescência, imunoblot, radioimunoprecipitação ou outros imunoensaios para confirmar a especificidade de anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O kit Gold ELISA HTLV-I/II é um método imunoenzimático (ELISA) para a detecção qualitativa de anticorpos contra o vírus linfotrópico das células T dos tipos I e II (HTLV-I e HTLV-II) em soro ou plasma humano.

O procedimento do ensaio é realizado em três etapas utilizando uma microplaca revestida com uma combinação de antígenos:

Na primeira etapa, as amostras e os soros controles são diluídos no Diluente de Amostra que é verde, diretamente na microplaca que contém antígenos recombinantes do vírus linfotrópico de linfócitos T humanos tipos I e II (HTLV-I e HTLV-II). A adição da amostra ou controle negativo resulta em uma mudança de coloração do diluente para azul e o controle positivo ocorre uma mudança para lilás, a qual pode ser monitorada fotometricamente em 620 ou 630 nm. Se anticorpos reativos para quaisquer um dos antígenos estiverem presentes nas amostras ou controles, eles se ligarão ao antígeno da fase sólida formando complexos antígeno-anticorpo, e não serão removidos na etapa de lavagem. Se anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II não estiverem presentes, os complexos não serão formados. Na etapa de lavagens subsequente, as proteínas não ligadas do soro ou plasma serão removidas.

Na segunda etapa de incubação, o conjugado [uma mistura de antígenos recombinantes (HTLV-I e HTLV-II) marcados com HRP (peroxidase)] irá se ligar aos anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II (IgG/IgM/IgA) específicos já ligados aos antígenos da fase sólida. É, então, realizada uma segunda etapa de lavagens, e os complexos de anticorpos já ligados à fase sólida e ao conjugado não serão removidos durante esta etapa. Nas amostras que não houver anticorpos específicos, o conjugado não se liga e será removido.

Na terceira etapa, ocorre a adição do substrato cromogênico [peróxido de hidrogênio e 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB)]. As amostras contendo anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II específicos apresentarão uma coloração no ponto final da reação, resultante da reação do conjugado marcado com HRP com o substrato cromogênico. Se o conjugado ligado estiver presente, o TMB será oxidado, resultando em um produto final colorido. Nesta reação, a peroxidase cliva o peróxido de hidrogênio para formar um composto intermediário que irá oxidar o TMB formando um produto azul. Ao final da incubação do cromógeno/substrato, é adicionado um reagente de bloqueio (Ácido Clorídrico 1M) às microcavidades para interromper a reação enzimática. Nesse meio ácido o produto TMB oxidado fica amarelo.

A intensidade da cor é proporcional à quantidade de conjugado ligado e, portanto, é uma função da quantidade de anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II presente na amostra. A intensidade da cor é medida com uma leitora padrão de microplacas ELISA (fotômetro) em um comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência 620/630 nm destinada a medir a absorbância do produto colorido.

REAGENTES

O kit é fornecido na apresentação de 480 testes.
Armazenar o kit de 2-8°C.

COMPONENTES	480 TESTES	Armazenamento
Microplacas Revestidas com antígenos recombinantes do vírus linfotrófico de linfócitos T humanos tipos I e II (HTLV-I e HTLV-II): Contém 96 cavidades compreendendo 12 tiras quebráveis de 8 cavidades cada.	5 microplacas	As microplacas não abertas devem ser armazenadas de 2-8°C, e são estáveis até a data marcada no rótulo da embalagem. Uma vez aberta, as tiras não usadas devem ser armazenadas de 2-8°C na embalagem original, com o dessecante, bem fechada, para protegê-las da exposição à umidade. A placa aberta mantida nas condições acima, é estável por 30 dias.
Dilúente de Amostra: Pronto para uso. Tampão fosfato-salina com estabilizantes e indicador colorimétrico de adição de amostra. Conservante: 2-cloroacetamida 0,1%.	1 frasco 50 mL	Devem ser armazenados de 2 a 8°C, sendo estáveis até a data impressa no rótulo.
Controle Positivo para anticorpos anti-HTLV-III (Humano): Pronto para uso. Soro inativado não reagente para o antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), anticorpos para o vírus da Hepatite C (HCV), Chagas, Sífilis, e anticorpos para o antígeno do core da hepatite B (HBc), HIV-1 e HIV-2. Conservante: Proclin 300 1%.	1 frasco 2 mL	
Controle Negativo : Pronto para uso. Soro humano não reagente para HBsAg e anticorpos para <i>T. cruzi</i> , HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II, HCV e HBc. Conservante: Proclin 300 1%..	2 frascos 1,5 mL	
Conjugado Enzimático: Pronto para uso. Contém mistura de antígenos recombinantes de HTLV-I e HTLV-II conjugados com peroxidase HRP, em Tampão fosfato-salina com estabilizantes e corante amarelo com estabilizadores protéicos. Conservante: Proclin 300 1%.	1 frasco 75 mL	
Substrato/Cromógeno: Pronto para uso. Contém 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e 0,27% de peróxido de hidrogênio.	1 frasco 75 mL	
Solução Bloqueadora: Pronto para uso. Ácido Clorídrico (HCl) 1M. CORROSIVO	1 frasco 50 mL	
Solução de Lavagem Concentrada 20x: Contém: Tampão fosfato-salina e detergente. Conservante: 2-cloroacetamida 2%.	3 frascos 100 mL	Devem ser armazenados de 2 a 8°C, sendo estáveis até a data impressa no rótulo. Após diluída, a Solução de Lavagem 1X é estável por 7 dias à temperatura ambiente (15°C - 30°C) ou 30 dias de 2 a 8°C.
Selos adesivos, descartáveis	20 unidades	
Instrução de Uso	1 unidade	

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipeta multicanal ajustável capaz de dispensar 50 µL e 100 µL (precisão: ± 5%) ou dispensador de reagente equivalente.
- Micropipeta de canal único fixo ou ajustável capaz de dispensar 50 µL (precisão: ± 5%) ou dispositivo de diluição-pipetagem equivalente.
- Ponteiras descartáveis para pipetas de 50 µL a 200 µL ou equivalente.
- Reservatório plástico para micropipeta multicanal.
- Lavadora de microplacas ELISA (parâmetros de Lavagem: no mínimo 300 µL de Solução de Lavagem 1X por cavidade; tempo de molho: 20 segundos). Consultar o Manual do Usuário do Equipamento para informações técnicas adicionais.
- Leitora de Microplaca ELISA com comprimento de onda duplo, com capacidade de leitura em 450 nm com um filtro de referência de 620 ou 630 nm. Se um equipamento sem um filtro de referência for utilizado, as áreas do fundo das microcavidades que estiverem opacas, arranhadas ou irregulares poderão causar leituras elevadas. A linearidade da leitora de microplacas deve variar de no mínimo 0 a 2,5 unidades de absorbância. Consultar as especificações do fabricante do equipamento.
- Incubadora 37°C ± 2°C.
- Água ultra-pura (Tipo I) ou destilada (Tipo II) são aceitáveis (Ver o item "Precauções").
- Hipoclorito de sódio 5,25% (desinfetante a base de cloro) ou outro desinfetante substituto aprovado para uso.

PRECAUÇÕES

I – Gerais

1. Somente para uso diagnóstico in vitro.
2. O Kit deve ser armazenado de 2-8°C. Deixar todos os reagentes do kit e as amostras atingirem a temperatura ambiente (15°C - 30°C) antes de usar (aproximadamente 30-60 minutos), e após o uso retornar os reagentes do kit a temperatura de 2-8°C.
3. Evitar o uso de geladeiras com descongelamento automático para o armazenamento dos reagentes e amostras. Repetidos ciclos de congelamento e descongelamento devem ser evitados, pois podem resultar na deterioração das amostras e fornecer resultados errôneos. Após o descongelamento, homogeneizar completamente as amostras antes de ensaiá-las.
4. Não utilizar reagentes com prazo de validade vencido. A data de validade do kit está indicada na rotulagem externa do mesmo.
5. Não misturar reagentes ou componentes de kits com números de lote diferentes ou de outros fabricantes. Quaisquer lotes de Dilúente de Amostra, Substrato/Cromógeno, Solução de Lavagem Concentrada 20X e Solução Bloqueadora podem ser usados como um "reagente genérico", desde que não sejam utilizados após a data de validade impressa no rótulo.
6. Usar somente material limpo no ensaio.
7. Nunca fumar, comer, beber ou aplicar cosméticos em áreas onde os kits e amostras são manipulados.
8. Evitar respingos ou a criação de aerossóis.
9. Nunca pipetar com a boca.
10. Evitar a contaminação cruzada entre reagentes, visto que esta irá invalidar os resultados do teste e diminuir a vida útil do produto. Para isto, recomenda-se o uso de recipientes rotulados para os reagentes adequados, bem como de novas ponteiras para a pipetagem de cada amostra e reagentes.
11. Quando estiver utilizando uma micropipeta de canal único para a adição manual de amostra, utilizar uma nova ponteira para cada amostra a ser ensaiada. Quando estiver utilizando uma micropipeta multicanal, novas ponteiras devem ser usadas para cada reagente a ser adicionado.
12. Todos os instrumentos de pipetagem devem ser usados com cuidado e calibrados regularmente, de acordo com as instruções do fabricante, e procedimentos de cada laboratório.

13. Não permitir que os vapores de hipoclorito de sódio ou outras fontes, isto é, agentes de limpeza, ácidos, solventes, etc. entrem em contato com as tiras de microcavidades durante a análise, porque isso poderá.

II – Biossegurança

14. Durante a realização do ensaio, utilizar luvas descartáveis, vestuário de proteção adequado e equipamentos de proteção individual (EPIs) e ao término do mesmo lavar muito bem as mãos.
15. Alguns componentes do kit contêm derivados de sangue humano. Os soros e plasmas usados na produção dos Controles Positivo e Negativo foram testados e demonstraram ser negativos para anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HBsAg, anti-HCV, anti-HBc, Chagas e Sífilis.
16. Entretanto, como nenhum método pode oferecer completa segurança de que os agentes infecciosos estejam ausentes, todo reagente e material derivado de sangue humano, inclusive as amostras de pacientes, devem ser manuseados como potencialmente infectantes. Recomenda-se que a manipulação destes reagentes e das amostras humanas seja realizada de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e Precauções Universais.
17. Descontaminar e descartar as amostras e todos os materiais potencialmente contaminados como se contivessem agentes infecciosos de acordo com a legislação local, estadual e federal. O método de autoclavagem a 121°C pode ser usado na descontaminação de materiais. Resíduos líquidos podem ser descontaminados com hipoclorito de sódio a 5,25% por no mínimo 60 minutos.

III – Reagentes

18. Alguns componentes deste kit podem conter substâncias químicas perigosas. Consultar a folha de dados de segurança do material (MSDS) para informações mais específicas.
19. Utilizar somente água ultra-pura (Tipo I) ou destilada (Tipo III) para fazer a diluição da Solução de Lavagem. Armazenar a água e a Solução de Lavagem 1X em recipiente não metálico.
20. O ProClin 300 é incluído como um conservante no Conjugado, no Controle Positivo e no Controle Negativo. A seguir os Requisitos de Frases de Segurança e Risco:
R: 34-43– Causa queimaduras. Irritante para os olhos, pele e sistema respiratório. Pode causar sensibilização em contato com a pele e por inalação. Perigo de sérios efeitos irreversíveis e danos aos olhos. Evidências limitadas de efeito carcinogênico.
S: 26-36/37/39-45– Em caso de contato com os olhos e pele enxaguar imediatamente com água e procurar assistência médica. Retirar imediatamente toda roupa contaminada. Não descartar na pia. Nunca adicionar água a este produto. Tomar medidas de precaução contra descargas estáticas. Utilizar avental, luvas e óculos de proteção. Não respirar os vapores/aerossóis. Em caso de acidente ou indisposição, procurar auxílio médico.
21. Manusear a Solução Substrato/Cromógeno com cuidado, uma vez que ela contém 3, 3', 5, 5' – Tetrametilbenzidina (TMB) e 0,27% de peróxido de hidrogênio; evitar contato com metal, usar somente material plástico ou revestido com teflon. O contato com metal pode reagir com ingredientes ativos da solução e interferir no resultado dos testes.
22. Evitar a inalação, ingestão ou contato do TMB 3, 3', 5, 5' – Tetrametilbenzidina com os olhos, pele ou vestuário, uma vez que o TMB pode causar irritação ou reação alérgica para pele. Se o TMB entrar em contato com a pele, lavar abundantemente com água. Em caso de reação alérgica ou mal estar, procurar um médico. Consultar a respectiva MSDS.
23. O Reagente Substrato/Cromógeno TMB é armazenado em um frasco restritivo à luz. Manter o frasco bem fechado quando não estiver em uso. Trazer o frasco à temperatura ambiente (15°C a 30°C) antes de abri-lo. Abrir o frasco lentamente e evitar a inalação de vapores. O Reagente Substrato/Cromógeno TMB é um líquido límpido de coloração azul clara para transparente. Se este se apresentar-se turvo ou com coloração azul escura, não utilizar.
24. A solução de bloqueio contém Ácido Clorídrico (HCl) 1M que é um ácido forte e corrosivo. Após o uso, descartá-la de acordo com regulamentos locais aprovados. Lavar as áreas atingidas com respingos imediatamente com água. Se o ácido entrar em contato com a pele ou olhos, lavar abundantemente com água por no mínimo 15 minutos e procurar assistência médica.

R: 34-37: Causa queimaduras. Irritante para o sistema respiratório.
S: 2/26: Manter afastado do alcance de crianças. Em caso de contato com os olhos e pele enxaguar imediatamente com água e procurar assistência médica.
Provoca corrosões e irrita os órgãos respiratórios.



IV – Microplacas

25. As tiras de microcavidades são seladas em embalagens protetoras com dessecante de umidade. Se ao abrir a embalagem o dessecante não estiver presente, não utilizar as tiras no ensaio. Quando retornar as tiras não usadas à embalagem para armazenamento, certificar-se da presença do dessecante antes de fechá-la. Anotar na embalagem a data de abertura da mesma e a data máxima de uso (30 dias a partir da data de abertura), antes de retornar as tiras não utilizadas para o armazenamento. Fechar bem a embalagem com uma fita adesiva ou através de selagem com calor. Anotar na embalagem, a data de cada vez em que a embalagem for aberta para teste, até o vencimento de sua validade.
26. Não tocar na superfície externa inferior das microcavidades. Impressões digitais ou arranhões podem interferir na leitura das microcavidades.

V – Procedimento

27. Assegurar-se de que a amostra foi adicionada às microcavidades. Falha na adição da amostra pode produzir um resultado errôneo. A adição das amostras às microcavidades pode ser monitorada visualmente ou por uma leitura fotométrica (Ver item c do Procedimento do Ensaio).
28. O Diluente de Amostra apresenta coloração verde. O Diluente de Amostra é um Reagente Colorimétrico que apresenta a capacidade de Monitoramento de Adição de Amostra; está designado a mudar de cor quando uma amostra ou controle for adicionado a ele, na cavidade teste. A não adição da amostra pode ser confirmada quando não ocorrer qualquer alteração da cor do Diluente de Amostras, de verde para azul. Os controles do ensaio são reagentes codificados por cor (com o uso de corantes ao invés de indicadores), e sua adição ao Diluente de Amostras irá provocar uma modificação da alteração da cor final do Diluente de Amostra.
29. Amostras que apresentam hemólise macroscópica podem não apresentar uma alteração de cor visível quando são adicionadas a microcavidades contendo Diluente de Amostra. Amostras hemolisadas poderão necessitar de confirmação visual de que o equipamento de pipetagem dispensou a amostra.
30. Certifique-se de que a temperatura da incubadora seja de 37± 2°C. Incubadoras de CO₂ não devem ser utilizadas.
31. Não utilizar banho-maria para incubação.
32. O comprimento estrito do procedimento de lavagem especificado é crucial para garantir um melhor desempenho do ensaio. (Ver a etapa 6 do item d do Procedimento do Ensaio).
33. Não deixar que as microcavidades sequem depois do ensaio ter se iniciado.
34. Antes de iniciar a leitura das microplacas, assegurar que as tiras de microcavidade se encontram niveladas no suporte e que o fundo da superfície exterior das microcavidades encontra-se limpo, seco, e livre de impressões digitais ou arranhões. Verificar também se não há a presença de bolhas na superfície do líquido das cavidades, visto que estes fatores podem interferir na leitura das microcavidades e resultados dos testes. Se necessário, limpar cuidadosamente o fundo da microcavidade com auxílio de um pano absorvente macio e sem fibras.
35. A leitora de microcavidades deverá conter um filtro de referência a um comprimento de onda de 620 nm ou 630 nm. Se for utilizado um equipamento sem um filtro de referência, as áreas no fundo das microcavidades que se encontrarem opacas, riscadas ou irregulares poderão originar leituras elevadas.
36. Os valores de controle negativo ou positivo que não se encontrarem dentro do intervalo esperado poderão indicar um problema técnico ou deterioração do produto.
37. Em ensaios automatizados, seguir estritamente as instruções de uso e manutenção contidas no manual do equipamento, para garantir um

adequado desempenho do ensaio, e evitar a contaminação das amostras e reagentes.

COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

A coleta de amostra não exige qualquer preparo especial do paciente/doador e deve ser feita assepticamente por punção venosa seguindo técnicas médicas aprovadas.

O ensaio pode ser realizado em soro ou plasma coletado com anticoagulantes à base de citrato, EDTA ou heparina, e deve ser efetuado assim que possível após a coleta. Não utilizar amostras de plasma que tenham sido coletadas com uma proporção inadequada de amostra/ anticoagulante.

Amostras de soro coletadas em tubos de soro seco ou em tubos gel separadores de soro, devem ser removidas do coágulo e centrifugadas dentro de 24 horas após a coleta.

O sangue deve coagular à temperatura ambiente (15-30°C) e ser centrifugado a 1500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O soro deve ser separado assim que possível e armazenado de 2- 8°C por até uma semana ou a -20°C (ou temperatura inferior) por períodos maiores. Devem ser evitados múltiplos ciclos de congelamento/descongelamento.

Usar preferencialmente amostras límpidas e sem hemólise. Precipitados presentes nas amostras podem ser removidos por centrifugação.

O descarte das amostras deve ser feito de acordo com os procedimentos locais e normas aplicáveis. Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes.

Se as amostras precisarem ser transportadas, elas deverão ser classificadas e embaladas de acordo com regulamentos e diretrizes aplicáveis.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

a) Instruções Gerais:

O Kit deve ser armazenado de 2-8°C. Deixar todos os reagentes do kit e as amostras atingirem a temperatura ambiente (15-30°C) antes de usar (aproximadamente 30-60 minutos), e após o uso retornar os reagentes do kit a temperatura de 2-8°C.

Nota: Se a Solução de Lavagem 1X for armazenada de 2-8°C, removê-la do armazenamento e colocá-la a temperatura ambiente (15-30°C) por tempo suficiente para trazer todo o reagente à temperatura ambiente. Misturar bem antes de usar.

1. Aproximadamente 30 a 60 minutos antes de começar o ensaio, trazer todos os componentes a temperatura ambiente (15-30°C).
2. Inverter cuidadosamente os reagentes líquidos algumas vezes para homogeneização, evitando a formação de espumas.
3. A temperatura da incubadora deve estar em 37°C ± 2°C.
4. Verificar se todos os equipamentos de dispensação estão ajustados para dispensar os volumes especificados, conforme estabelecido no procedimento do ensaio, seguindo as instruções do fabricante do equipamento. Para pipetagem automatizada, seguir as recomendações do fabricante do equipamento.
5. A não adição de amostra pode ser monitorada visualmente ou fotometricamente conforme item c do Procedimento do Ensaio.

b) Preparação dos reagentes:

b.1) Diluir a Solução de Lavagem conforme descrito abaixo:

Preparação da Solução de Lavagem 1X: Agitar um frasco de Solução de Lavagem 20X e inverter seu conteúdo em uma proveta de 2 litros ou recipiente plástico. Enxaguar 3 vezes o frasco de Solução de Lavagem 20X vazio com

água ultra-pura (Tipo I) ou destilada (Tipo II) e transferir a água do enxágue para a proveta contendo a Solução de Lavagem. O enxágue do recipiente original com água a temperatura ambiente (15-30°C) garante a dissolução completa de possíveis cristais formados durante o armazenamento de 2-8°C. Completar o volume para 2 litros com água ultra-pura (Tipo I) ou destilada (Tipo II temperatura ambiente. Tampar o recipiente graduado ou calibrado, e homogeneizar por inversão cuidadosamente algumas vezes. A Solução de Lavagem diluída 1X é estável por 7 dias à temperatura ambiente. Para armazenamento por períodos mais longos (até 30 dias), armazenar de 2-8°C, e trazer a Solução de Lavagem 1X à temperatura ambiente (15°C-30°C) antes de usar. Anotar no recipiente a data em que a Solução de Lavagem (1X) foi preparada e a data de validade. Descartar a Solução de Lavagem (1X) se esta apresentar contaminação ou turvação aparente.

NOTA 1: Qualquer número de Lote da Solução de Lavagem Concentrada 20X pode ser usado como um "reagente genérico" para preparar a Solução de Lavagem 1X, desde que o mesmo seja não usado após sua data de validade impressa no rótulo.

NOTA 2: Certificar-se de que a Solução de Lavagem 1X preparada se encontra a temperatura ambiente (15-30°C) antes de começar o ensaio.

NOTA 3: A Solução de Lavagem Concentrada 20X mantida de 2-8°C pode conter precipitados químicos cristalizados, uma vez que é uma solução saturada. Agitar bem a Solução de Lavagem Concentrada 20X antes de usar e diluir conforme descrito acima. Todos os componentes químicos serão solubilizados na concentração de 1X da solução de lavagem. Se um volume menor de Solução de Lavagem 1X precisar ser preparado (inferior ao total do frasco de Solução de Lavagem Concentrada 20X), aquecer a Solução de Lavagem 20X em banho-maria por até 1 hora e misturar bem para a dissolução de qualquer precipitado químico antes da diluição da Solução de Lavagem 1X.

b.2) Substrato/Cromógeno:

O Substrato/Cromógeno é um reagente "pronto para uso". Porém, qualquer excesso de reagente não utilizado não deve ser retornado ao frasco original e deve ser descartado ao final do ensaio. Antes do final da segunda incubação, transferir uma quantidade suficiente de Substrato/Cromógeno para um recipiente apropriado e proteger o conteúdo da luz. Cada microplaca requer no mínimo 10 mL de Substrato/Cromógeno. Uma quantidade maior pode ser necessária dependendo do dispensador de reagente utilizado. Ver as instruções do fabricante do equipamento para volumes necessários de cada reagente. Seguem abaixo diretrizes para uso geral:

Número de Cavidades	Número de Placas	Substrato/Cromógeno (mL)
48	0,50	5
96	1	10
192	2	20
288	3	30
384	4	40
480	5	50

- Não utilizar mais do que um único lote de Substrato/Cromógeno em uma mesma placa. Qualquer número de Lote do Substrato/Cromógeno pode ser utilizado como um "reagente genérico", desde que o mesmo não seja usado após sua data de validade impressa no rótulo.
- Utilizar somente recipientes plásticos limpos, e evitar o contato com qualquer metal.
- O Substrato/Cromógeno é estável em seu frasco original até a data de validade impressa no rótulo, quando armazenado adequadamente. Uma vez removido de seu frasco original para uso, é estável por quatro horas após sua transferência para um recipiente plástico à temperatura ambiente no escuro (proteger o conteúdo da luz cobrindo o recipiente).

- O Substrato/Cromógeno deve apresentar uma coloração azul clara à incolor e límpida. **Se for verificada uma coloração azul intensa ou turvação, descartar, e usar uma nova alíquota.**

c) Monitoramento da Adição de Amostras:

- Inspeccionar visualmente as microcavidades após a adição das amostras. O Diluente de Amostra apresenta coloração verde. Ao adicionarmos a amostra e controle negativo, a coloração do líquido na cavidade passa a ser azul, já o controle positivo passa a ser lilás. A não adição da amostra pode ser confirmada quando não ocorrer qualquer alteração da cor do Diluente de Amostra de verde para azul.
- Se não ocorrer alteração de cor, o resultado da amostra deve ser anulado, e um novo teste deve ser efetuado de forma adequada. Voltar a testar a amostra em uma única microcavidade e confirmar visualmente a adição da amostra. Não são necessários quaisquer testes adicionais caso não ocorra alteração de cor após novo teste, uma vez que a adição da amostra tenha sido confirmada visualmente.

d) Procedimento:

- Determinar o número total de cavidades necessárias para o ensaio. Em cada ensaio deverão ser incluídos 3 controles negativos e 2 controles positivos. As cavidades não usadas devem ser armazenadas de 2-8°C bem fechadas na embalagem de alumínio fornecida, com o dessecante.
- Preparar o mapa da placa identificando a localização das amostras e controles nas microcavidades.

Cavidades 1A, 1B, 1C				Controle Negativo (CN)								
Cavidades 1D, 1E				Controle Positivo (CP)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN											
B	CN											
C	CN											
D	CP											
E	CP											
F												
G												
H												

Exemplo de um mapa da placa indicando a localização dos controles

- Adicionar os controles e as amostras às cavidades conforme abaixo (ver item c acima sobre monitoramento da adição de amostras):
 - Adicionar **50 µL** de Diluente de Amostra em todas as cavidades.
 - Adicionar **50 µL** de cada amostra ou controles às cavidades apropriadas (segundo o mapa da placa).
- Para processamento manual das placas de microcavidades, cobrir o suporte da microplaca com um selo adesivo. Se estiver utilizando um processador de microplacas automatizado para a incubação, seguir as recomendações do fabricante do equipamento com relação à vedação da placa.
- Incubar à **37°C ± 2°C** por **30 ± 2 minutos**.
- Com um equipamento de aspiração-lavagem, aspirar e lavar todas as cavidades **5 vezes com tempo de molho de 20 segundos** com a Solução de Lavagem 1X diluída (ver item b.1 acima), conforme descrito abaixo:

ATENÇÃO: é crucial que o procedimento de lavagem especificado seja estritamente seguido para garantir um ótimo desempenho do ensaio. Seguir as etapas especificadas para garantir uma lavagem completa.

- Aspirar as soluções das microcavidades e preenchê-las completamente com a Solução de Lavagem (no mínimo 300 µL de solução de Lavagem 1X por cavidade). Não permitir que as cavidades transbordem. Usar aproximadamente 20

segundos de tempo de molho entre as lavagens (adição da Solução de Lavagem 1X e aspiração subsequente).

- Completar a sequência de aspiração-lavagem por mais quatro vezes.
- Aspirar as cavidades completamente. Inverter a microplaca e bater firmemente contra um papel toalha limpo para remover o excesso de Solução de Lavagem, se necessário.

Obs.: se a lavadora usada não tiver ajuste para tempo de molho, incluir mais um ciclo de lavagem (lavar 6x ao invés de 5x).

- Adicionar **100 µL** de Conjugado em todas as cavidades. Para processamento manual das placas de microcavidades, cobrir a placa com um novo selo adesivo ainda não usado. Se estiver utilizando um processador de microplacas automatizado para a incubação, seguir as recomendações do fabricante do equipamento com relação à vedação da placa.
- Incubar à **37°C ± 2°C** por **30 ± 2 minutos**.
- Após a segunda incubação, repetir as lavagens das cavidades conforme descrito no item 6 acima.
- Adicionar **100 µL** de Substrato/Cromógeno a todas as cavidades (ver item b.2).
- Incubar à **temperatura ambiente (15-30°C)**, no escuro, por **15 ± 1 minutos**. **Nota: O bloqueio da reação após o período de tempo de 15 ± 1 minutos é crítico para os resultados do ensaio.**
- Adicionar **50 µL** de Solução Bloqueadora a todas as cavidades. Para garantir uma mistura adequada, o ácido deve ser adicionado firmemente em um fluxo constante. Se necessário, homogeneizar a placa cuidadosamente ou usar um agitador de microplacas para misturar o conteúdo. Tomar cuidado para evitar respingos do conteúdo da microplaca. Se estiver utilizando um processador de microplacas automatizado para a incubação, seguir as recomendações do fabricante do equipamento com relação à homogeneização.
- Ler as tiras de microcavidades em um comprimento de onda de **450 nm** com um filtro de referência de **620 ou 630 nm**.

NOTA 1: As placas de tiras de microcavidades devem ser lidas dentro de 60 minutos após a adição da Solução Bloqueadora. As placas devem ser mantidas no escuro até o momento da leitura.

NOTA 2: Antes da leitura, limpar o fundo exterior da placa com um tecido ou papel toalha macio e isento de fibras.

PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE / CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

1. Critério de Aceitação do Controle Negativo

- Os valores dos controles negativos individuais devem ser menores ou iguais a 0,200 e maiores ou iguais a -0,005. Números que estiverem entre 0,000 e -0,005 inclusive são válidos e devem ser arredondados para 0,000 para efeito de cálculo. Se um dos três valores do controle estiver fora desses limites, recalcular a média do controle negativo (CNx médio) baseando-se nos dois valores de controle aceitáveis. A placa é inválida e o teste deve ser repetido se dois ou mais dos três valores de controle estiverem fora desses limites e variarem em mais de 20% entre si.
- Determinar a média dos valores de controle negativo (CNx médio).

Exemplo:

Controle Negativo	Absorbância
1	0,036
2	0,040
3	0,038
Absorbância Total	0,114

CNx médio = Absorbância Total / 3 = 0,038

Desvio Padrão (DP) = 0,002

Coefficiente de Variação (CV) = DP / CNx x 100 = 5,26 %

2. Critério de Aceitação do Controle Positivo

O controle positivo é usado para verificar se os componentes do kit são capazes de detectar uma amostra reagente desde que o procedimento do ensaio tenha sido estritamente seguido.

Uma placa é considerada válida somente se o controle positivo atingir os seguintes critérios:

- O valor de absorbância do controle positivo for maior ou igual a 0,500 e estiver dentro do intervalo linear da leitora de microplacas.
- Se qualquer valor de controle estiver fora desses limites, o ensaio é considerado inválido e deverá ser repetido.

NOTA: Resultados acima do limite superior do intervalo linear da leitora de microplacas podem aparecer como "OVER" ("ACIMA") ou "****" ou ">".

Seguir as normas locais quanto à inclusão de amostras controles adicionais ("controles externos"), que não os fornecidos como parte do kit. Mesmo que sejam incluídas no teste amostras adicionais para controles de qualidade interno ou externo, os controles positivo/negativo do kit **devem ser sempre** incluídos.

CÁLCULO DO VALOR DE CUT-OFF

Valor de cut-off = média das DOs do CN + 0,250

Exemplo:

Controle Negativo	Absorbância
1	0,036
2	0,040
3	0,038
Absorbância Total =	0,114

Média do CN = Absorbância Total / 3 = 0,038

Valor de Cutoff = 0,038 + 0,250 = 0,288

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Amostras com valores de absorbância menores que -0,025 devem ser re-ensaiadas em uma microcavidade única. A amostra deve ser considerada não reagente se o valor de absorbância lido na repetição for menor que o valor de 0,9 x cut-off, mesmo que o valor de absorbância lido na repetição permanecer menor que -0,025.
- Amostras com valores de absorbância menores que o valor do cut-off x 0,9 são consideradas não reagentes (10% abaixo do cut-off do ensaio ou $\leq 0,9$ de índice reatividade). Ensaio adicional não é necessário.
- Amostras com valores de absorbância maiores ou iguais ao valor de cut-off x 1,1 (10% acima do cut-off do ensaio ou $\geq 1,1$ de índice de reatividade) são consideradas inicialmente reagentes (IR) e devem ser re-ensaiadas em duplicata antes da interpretação final.
- Amostras dentro da Zona Cinza (ZC), ou seja, com índice de reatividade entre 0,9 e 1,1 vezes o do cut-off são tratadas como inicialmente reagentes (IR) e devem ser re-ensaiadas em duplicata antes da interpretação final.
- Após re-ensaiar uma amostra inicialmente reagente (IR) ou dentro da Zona Cinza (ZC):

- a amostra é considerada não reagente (NR) para anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II se ambas duplicatas forem não reagentes, isto é, menores ou iguais ao valor do cut-off x 0,9.
- a amostra é considerada repetidamente reagente (RR) para anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II se ambas as duplicatas forem reagentes, isto é, maiores ou iguais ao valor de cut-off x 1,1.
- a amostra é tratada como inconclusiva (INC) para anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II se uma ou ambas duplicatas estiverem dentro da Zona Cinza (ZC) ou apresentarem resultados discordantes entre si.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O uso do kit deve ser realizado somente por profissionais capacitados e adequadamente treinados.

O Procedimento do Teste e a Interpretação dos resultados do kit GOLD ELISA HTLV-I/II devem ser estritamente seguidos para garantir a exatidão dos resultados obtidos quando se estiver realizando um ensaio para determinar a presença de anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II em soro ou plasma humano. Como o kit GOLD ELISA HTLV-I/II foi desenvolvido para a triagem de unidades individuais de sangue ou plasma, a maior parte dos dados referentes a sua interpretação são provenientes de ensaios de amostras individuais. Não há dados para interpretar os testes realizados em outros fluidos corporais, como: soro e plasma de cadáveres, amostras de animais, pool de amostras de sangue ou plasma processado e produtos feitos a partir desses pools; portanto, o ensaio dessas amostras não é recomendado.

O kit GOLD ELISA HTLV-I/II detecta anticorpos anti-HTLV-I e/ou anti-HTLV-II em soro ou plasma e por isso é útil na triagem de doadores de sangue, na avaliação de pacientes com sinais e sintomas de ATL/HAM e estabelecimento de infecção inicial pelo HTLV-I e/ou HTLV-II. Os resultados dos testes devem ser avaliados em relação aos sintomas do paciente, história clínica, e outros dados laboratoriais para estabelecer o diagnóstico.

A presença de anticorpos em uma única amostra não é evidência suficiente para distinguir entre infecção ativa e contato anterior com o agente, ou até reações cruzadas. É recomendado que amostras repetidamente reagentes (RR) sejam investigadas por testes complementares específicos.

Resultados falso-negativos podem ocorrer se a quantidade de anticorpos presentes na amostra for muito baixa para o limite de detecção do ensaio, ou se o anticorpo que é detectado não estiver presente durante o estágio da infecção na qual a amostra foi coletada.

A repetição do teste deve ser considerada quando houver suspeita clínica da infecção ou de erro no procedimento. Algumas fontes de erros do procedimento podem ser:

- Armazenamento inadequado das tiras não utilizadas e de reagentes.
- Contaminação cruzada ou microbiana de reagentes ou amostras.
- Erros na adição de amostras ou reagentes.
- Uso de amostras hemolisadas, amostras contendo materiais particulados, ou amostras que tenham sido inativadas por calor, ou que possam ter sido comprometidas por repetidos ciclos de congelamento-descongelamento.
- Lavagem inadequada das microplacas.
- Leitura incorreta das microplacas, devido uso de microplacas com a superfície inferior externa suja ou contendo arranhões.
- Desvio de procedimento de temperatura e tempo do ensaio em etapas de incubação.

O controle positivo do kit não é destinado para quantificar a sensibilidade do ensaio.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A – Repetitividade

Em todas as apresentações do kit, foram ensaiadas em uma mesma microplaca, 30 replicatas de uma amostra de soro positivo e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo para HTLV.

Resultados do teste de repetitividade do kit Gold ELISA HTLV-I/II

Tipo de amostra	Média do Índice de Reatividade	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
Amostra Positiva	0,366	0,037	10,19
Amostra Negativa	0,037	0,003	8,60

B – Reprodutibilidade

Em todas as apresentações do kit, foram ensaiadas, por dia em uma mesma microplaca, 10 replicatas de uma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo para HTLV. Esse ensaio foi repetido em 5 dias diferentes, com diferentes operadores e pipetas.

Resultados do teste de reprodutibilidade do kit Gold ELISA CHAGAS

Tipo de amostra	Média do Índice de Reatividade	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
Amostra Positiva	0,365	0,030	8,16
Amostra Negativa	0,039	0,003	7,22

C – Especificidade

A especificidade do kit Gold ELISA HTLV-I/II foi avaliada numa população de 8.748 doadores de sangue voluntários, presumivelmente saudáveis, de cinco locais diferentes. Desse total de amostras negativas testadas, 4 deram resultados inicialmente positivos ou inconclusivos e 3 permaneceram com resultados positivos ou inconclusivos após repetição em duplicata. Portanto, a especificidade (Índice de Confiança 95%) relativa obtida foi de 99,7 (99,5 – 99,8). Os resultados estão resumidos na tabela abaixo:

Especificidade frente a amostras negativas

Número de amostras testadas	Nº de amostras inicialmente reagentes ou inconclusivos	Nº de amostras repetidamente reagentes ou inconclusivos	Especificidade
8.748	4	3	99,97 %

D – Sensibilidade

A sensibilidade do kit Gold ELISA HTLV-I/II foi determinada testando dois painéis disponíveis comercialmente: PRP206 - constituído de 14 amostras positivas e uma negativa, e PRP207- constituído também de 14 amostras positivas e uma negativa. Além disso, foram testadas 95 amostras positivas de painéis in-house dos mais diferentes títulos, originadas de bolsas de sangue positivas doadas por bancos de sangue credenciados e 12 amostras positivas testadas no próprio hemocentro. Todas as amostras positivas testadas foram reagentes com o kit Gold ELISA HTLV-I/II, resultando uma sensibilidade relativa de 100%. Os resultados estão resumidos na tabela abaixo:

Sensibilidade frente a amostras positivas

Número de amostras positivas testadas	Nº de amostras reagentes	Nº de amostras não reagentes	Sensibilidade
135	135	zero	100 %

E – Estudos de Diluição (Limite de Detecção)

Foram ensaiadas 10 amostras caracterizadas como positivas para HTLV pelo método de referência Western Blot. Essas amostras apresentaram bandas diferentes e das mais variadas intensidades no teste de Western Blot. Todas apresentaram resultados positivos no kit Gold ELISA HTLV-I/II.

F – Análise de Interferentes e Reação Cruzada

As amostras que se seguem foram todas consideradas negativas para HTLV.

Estudo de Interferentes e Reação Cruzada no kit Gold ELISA HTLV-I/II

Tipo de amostra	Número de amostras testadas	Resultado positivo
Lipêmica	3	0
Fator Reumatóide	3	0
Hemolisada	3	0
Chagásica	2	0
HBc	2	0
HIV	2	0
HCV	2	0
HBsAg	2	0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUT, A. Human T-Cell Lymphotropic Viruses Type 1 and 2 (HTLV-I/II). *Infusionsther Transfusionsmed*, 26: 321-326, 1999.
- AL JAOUNI, S. K. Prevalence of antibodies to human T-Lymphotropic virus types I and II among Saudi Arabian blood donors. *Annals of Saudi Medicine*. Vol. 20 (2): 155-156, 2000.
- CDC. Current trends Human T-Lymphotropic Virus Type I screening in volunteer Blood donors – United States, 1989. *MMWR*. 39 (50): 915, 921-924. December 21, 1990.
- DOURADO, I.; ANDRADE, T.; CARPENTER, C.L.; GALVÃO-CASTRO, B. Risk factors for human T-cell Lymphotropic Virus Type I among injecting drug users in Northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 94 (1): 13-18. Jan. /Feb. 1999.
- CANN, A.J.; CHEN, I.S.Y. Human T-Cell Leukemia Virus I and II. *Virology*. Second Edition. New York. Raven Press Ltd. Chapter 52, p. 1501-1519, 1990.
- HORAL, P.; HALL, W.W.; SVENNERHOLM, B.; LYCKE, J.; JEANSSON, S.; RYMO, L.; KAPLAN, M.H.; VAHLNE, A. Identification of type-specific linear epitopes in the glycoproteins gp46 and gp21 of human T-cell leukemia viruses type I and type II using synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 88. pp. 5754-5758, July, 1991. Medical Sciences.
- FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. 2ª Edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A., cap. 22. p. 241-249, 2001.
- Takei K. Infecções Transfusoriais. In: Vaz, A. J.; Takei K., Bueno E.C. *Imunoensaios Fundamentos e Aplicações*. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2007. p. 236-255.
- LAL, R.B.; OWEN, S.M.; SEGURADO, A.A.C.; GONGORA-BIANCHI, R.A. Mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Arch. Intern. Med.*, v. 120, p. 300-1, 1994.

10. LEVINE, P.H.; JACOBSON, S.; ELLIOTT, R.; CAVALLERO, A.; COLCLOUGH, G.; DORRY, C.; STEPHENSON, C.; KNIGGE, R.M.; DRUMMOND, J.; NISHIMURA, M.; TAYLOR, M.E.; WIKTOR, S.; SHAW, G.M. HTLV-II infection in Florida Indians. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, v. 9, p. 123-7, 1993.
11. MALONEY, E.M.; BIGGAR, R.J.; NEEL, J.V.; TAYLOR, M.E.; HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; BLATTNER, W.A. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. *J. Infect. Dis.*, v. 166, p. 100-7, 1992.
12. MOROFUJI-HIRATA, M.; KAJIYAMA, W.; NAKASHIMA, K.; NOGUCHI, A.; HAYASHI, J.; KASHIWAGI, S. Prevalence of antibody to human T-cell lymphotropic virus type I in Okinawa, Japan, after an interval of 9 years. *Am. J. Epidemiol.*, v. 137, p.43-8, 1993.
13. ROSENBLATT, J.D.; PLAGER-MARSHALL, S.; GIORGI, J.V.; SWANSON, P.; CHEN, I.S.Y.; CHIN, E.; WANG, H.J.; CANAVAGGIO, M.; BLACK, A.C.; LEE, H. A clinical, hematologic and immunologic analysis of 21 HTLV-II infected intravenous drug users. *Blood*, v. 76, p.409-17, 1990.
14. Sullivan MT, Williams AE, Fang CT, Nortari EP et al. Human T-Lymphotropic virus (HTLV) types I and II infection in sexual contacts and family members of blood donors who are seropositive for HTLV type I or II. *Transfusion* 1993; 33(7):585-90.
15. Gessain A, Gout O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Ann Intern Med* 1992; 117(11):933-46.

IMPORTANTE: Para assegurar o bom desempenho do ensaio é recomendado que todas as orientações e procedimentos descritos sejam estritamente seguidos.

SIMBOLOGIA

Data da Edição da Bula: 05 MAI 11



Somente para uso diagnóstico In Vitro

Revisão: 02/11



Potencialmente Infectante



Corrosivo



Suficiente para 480 testes



Nº de Lote



Data de Validade



Armazenar de 2-8°C



Código do Fabricante

Consultar as Instruções de Uso



Distribuído por: REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282 – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900
CNPJ: 47.334.701/0001-20

Fabricado por: REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282, 1º andar – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900
CNPJ: 47.334.701/0006-35

Serviço de Atendimento ao Cliente:
REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282 – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900
CNPJ: 47.334.701/0001-20