



MD 1434 Y 2020.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1434** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2019 0086 (22) Data depozit: 2019.07.31	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.05.31, BOPI nr. 5/2020
(71) Solicitant: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: SPINU Constantin, MD; ISAC Maria, MD; SAJIN Octavian, MD; MIRON Aliona, MD; SPÎNU Igor, MD; PLĂCINTĂ Gheorghe, MD; DONOS Ala, MD	
(73) Titular: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Metodă de identificare a markerului anti-HTLV-1/2 în serul sangvin uman**(57) Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului infecției hemotransmisibile, provocate de HTLV-1/2 și poate fi utilizată pentru diagnosticul de laborator în scop științific sau practic.

Esența invenției constă în efectuarea testului imunoenzimatic, care include elaborarea unui martor reagent, care conține ser negativ anti-HTLV-1/2 și unui martor neutralizant, care conține ser pozitiv anti-HTLV-1/2, apoi se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-HTLV-1/2, în care se adaugă reagenții: în godeul A1 se adaugă 100 μl de martor reagent, în godeul B1 se adaugă 100 μl de martor neutralizant, în godeurile C1, E1 și G1 se adaugă câte 40 μl de diluant pentru probă, care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser cercetat, și câte 50 μl de martor reagent, iar în godeurile D1, F1 și H1 se

2
adaugă câte 40 μl de diluant pentru probă, care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser cercetat, și câte 50 μl de martor neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon, care conține tris HCl tampon, 0,5% Tween 20 și 0,1% Proclin mM 300 și diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi în toate godeurile, cu excepția A1, se adaugă câte 100 μl de enzimă conjugată, care conține imunoglobulină anti-umană IgG și peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C, timp de 60 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluție tampon și se adaugă câte 50 μl de cromogen, care conține soluție tampon citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μl de substrat, care conține soluție tampon de tetrametilbenzidină și se incubează la

MD 1434 Y 2020.05.31

temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densității optice la lungimea de undă de 450/620 nm și se calculează după formula: martor reagent/martor neutralizant

pentru anti-HTLV-1/2, în cazul în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0 - un rezultat pozitiv.

Revendicări: 1

(54) Method for identification of anti-HTLV-1/2 marker in human blood serum

(57) Abstract:

1

The invention relates to medicine, in particular to a method for identifying a marker of hemotransmissible infection caused by HTLV-1/2 and can be used for laboratory diagnostics for scientific or practical purposes.

Summary of the invention consists in conducting an immunoenzyme assay, which includes the development of a control reagent, comprising negative anti-HTLV-1/2 serum and a neutralizing control, comprising positive anti-HTLV-1/2 serum, then it is used a plate with wells for anti-HTLV -1/2, into which are added reagents: 100 μl of control reagent is added into well A1, 100 μl of neutralizing control is added into well B1, 40 μl of test diluent comprising 10% phosphate buffer solution, 0.14 bovine serum, albumin and 10 μl of test serum, and 50 μl of control reagent is added into wells C1, E1 and G1, and 40 μl of test diluent comprising 10% phosphate buffer solution, 0.14 bovine serum, albumin and 10 μl of test serum, and 50 μl of neutralizing control is added into wells D1, F1 and H1, then the samples are incubated at a temperature of 37°C, for 30 min, afterwards all wells are

2

washed 5 times with buffer solution, comprising Tris-HCl buffer, 0.5% Tween 20 and 0.1% Proclin mM 300 and diluted with distilled water in a ratio of 1:25, then into all wells, except A1, is added 100 μl of conjugated enzyme, comprising anti-human immunoglobulin IgG and peroxidase, afterwards are incubated at a temperature of 37°C, for 60 min, then all wells are re-washed 5 times with buffer solution and is added 50 μl of chromogen, comprising phosphate citrate buffer solution, hydrogen peroxide and 50 μl of substrate, comprising tetramethylbenzidine buffer solution and are incubated at a temperature of 18...24°C, for 30 min, afterwards the reaction is stopped by adding 100 μl of 0.5 M sulfuric acid, then are determined the optical density values at a wavelength of 450/620 nm and calculated by the formula: control reagent/neutralizing control for anti-HTLV-1/2, if the ratio is less than 2.0 it is determined a negative result, and if it is more than 2.0 – a positive result.

Claims: 1

(54) Метод идентификации маркера анти-НТЛV-1/2 в сыворотке крови человека

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине, в частности к методу идентификации маркера гемотрансмиссивной инфекции, вызванной НТЛV-1/2 и может быть использовано для лабораторной диагностики в научных или практических целях.

Сущность изобретения состоит в проведении иммуноферментного теста, который включает разработку контрольного реагента, который содержит отрицательную сыворотку анти-НТЛV-1/2 и нейтрализующего контроля, который содержит положительную сыворотку анти-НТЛV-1/2, затем используют планшет с лунками для анти-НТЛV-1/2, в которые добавляют реагенты: в лунку А1 добавляют 100 мкл контрольного реагента, в лунку В1 добавляют 100 мкл нейтрализующего контроля, в лунки С1, Е1 и G1 добавляют по 40 мкл пробного разбавителя, содержащего 10%-й фосфатный буферный раствор, 0,14 бычьей сыворотки, альбумин, и 10 мкл исследуемой сыворотки, и по 50 мкл контрольного реагента, а в лунки D1, F1 и H1 добавляют по 40 мкл пробного разбавителя, содержащего 10%-й фосфатный буферный раствор, 0,14 бычьей сыворотки, альбумин, и 10 мкл исследуемой сыворотки, и по 50 мкл нейтрализующего контроля, затем пробы инкубируют при температуре 37°C, в

2

течение 30 мин, после чего все лунки промывают 5 раз буферным раствором, содержащим трис-НСl-буфер, 0,5% Tween 20 и 0,1% Проклин mM 300 и разбавленным дистиллированной водой при соотношении 1:25, затем во все лунки, кроме А1, добавляют по 100 мкл конъюгированного фермента, содержащего анти-человеческий иммуноглобулин IgG и пероксидазу, после чего инкубируют при температуре 37°C, в течение 60 мин, затем все лунки повторно промывают 5 раз буферным раствором и добавляют по 50 мкл хромогена, содержащего цитрат фосфатный буферный раствор, перекись водорода и по 50 мкл субстрата, содержащего тетраметилбензидиновый буферный раствор и инкубируют при температуре 18...24°C, в течение 30 мин, после чего реакцию останавливают добавлением по 100 мкл 0,5 М серной кислоты, затем определяют значения оптической плотности при длине волны 450/620 нм и рассчитывают по формуле: контрольный реагент/нейтрализующий контроль для анти-НТЛV-1/2, в случае если соотношение меньше 2,0 определяют отрицательный результат, а если больше 2,0 - положительный результат.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului infecției hemotransmisibile, provocate de HTLV-1/2 și poate fi utilizată pentru diagnosticul de laborator în sângele donatorilor de sânge, transplant, contingentului medical, populației generale și în special la persoanele cu risc sporit de infectare (utilizatori de droguri intravenoase, persoanele aflate la tratament de hemodializă, medicii antrenați în manopere invazive etc.) pentru reducerea riscului de transmitere ale acestor infecții.

10 Datele statistice arată că cel puțin de la cinci până la zece milioane de persoane din întreaga lume sunt infectate cu HTLV-1 și între trei și cinci milioane de oameni din întreaga lume sunt infectați cu HTLV-2. Ratele de seroprevalență ale HTLV diferă în funcție de aria geografică, compoziția sociodemografică și riscuri individuale de comportament. La nivel mondial, ratele de seroprevalență HTLV-1 tind să crească odată cu vârsta și sunt mai mari la bărbați decât la femei. În Europa, unde infecția cu HTLV-2 se întâlnește aproape exclusiv în rândul utilizatorilor de droguri intravenoase, se estimează aproximativ de la 20000 până la 40000 de persoane infectate (Gessain A., Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front Microbiol. No 3, 2012, p. 388; doi : 10.3389/fmicb.2012.00388. [PubMed: 23162541]).

15 În Brazilia, statisticile arată că 2,5 milioane de persoane sunt infectate cu HTLV-1, reprezentând numărul cel mai mare de indivizi din lume infectați cu acest virus (Kozłowski A.G., Matos M.A., Carneiro M.A., Lopes C.L., Teles S.A., Vicente C.P., Martins R.M. Seroprevalence of HTLV in a population of HIV1-infected patients in midwestern Brazil).

20 Pentru depistarea agenților cauzali ai infecțiilor virale se utilizează diferite metode de diagnostic, inclusiv metode serologice, care contribuie la determinarea agentului cauzal prin reacția imunoenzimatică (ELISA), care include metoda indirectă - determină indirect prezența Ag în organismul uman cu folosirea anticorpilor HTLV-1/2, formați în procesul răspunsului imunologic al organismului uman la pătrunderea agentului infecțios. În multe cazuri este necesar de efectuat 2 sau mai multe metode de diagnostic, deseori se impune efectuarea repetată a investigațiilor de laborator (A. Calancea, S. Carajia, R. Cojocaru et al. Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale B, C și D, instructiuni metodice, Chisinau, 2008). Investigațiile la prezența anti-HTLV-1/2 se efectuează prin metoda imunoenzimatică ELISA conform instrucțiunilor comerciale.

25 Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este o tehnică imunoenzimatică utilizată frecvent pentru identificarea prezenței anticorpilor în proba testată. Metoda ELISA decurge în câteva etape:

- formarea complexului imunochimic prin adăugarea markerului enzimatic;
- spălarea fazei solide pentru îndepărtarea componentelor nespecifice;
- adăugarea soluției cromogen/substrat și stoparea reacției;
- citirea rezultatelor și interpretarea lor.

30 Principiul metodei de identificare cunoscute include inițial blocarea totală sau parțială a încărcăturii antigenice de pe pereții godeurilor stripului de către anticorpii serului investigat cu adăugarea în continuare a serului standardizat pentru evidențierea antigenului de pe suprafața godeului neconjugat. Acest fenomen este evidențiat în continuare prin analiza imunoenzimatică. Schema generală a reacției ELISA: testarea serului uman se realizează în 2 godeuri. În primul godeu se adaugă serul negativ cu anticorpii markerilor infecțiilor - martor reagent (MR), simultan cu serul pacientului, în al doilea - serul pozitiv, martor neutralizant (MN), simultan cu serul pacientului. După incubarea și detectarea anticorpilor infecțiilor se analizează rezultatele obținute [1].

35 Dezavantajele metodei cunoscute sunt: sensibilitatea și specificitatea joasă în comparație cu reacția de polimerizare în lanț (PCR), analiza prin imunoblot, RIA. Confirmarea probelor inițial pozitive sau incerte la prezența markerilor infecțiilor hemotransmisibile prin imunoblot sau PCR cere resurse financiare suplimentare. Dependența reacției enzimatice de factorii fizico-chimici (temperatură, umiditatea, pH, calitatea apei, lumina și al.). Folosirea în componența kiturilor diagnostice ale substanțelor cu efect cancerigen sau toxic. Analiza și evaluarea revistei literaturii a demonstrat că pe piață nu se regăsesc teste comerciale pentru identificarea markerului anti-HTLV-1/2. În legătură cu absența testului comercial imunologic pentru identificarea markerului virusului limfotrop uman tip 1/2 (HTLV-1/2) a fost necesar de a elabora o metodă de identificare a probelor de ser uman pozitive și incerte la prezența markerilor infecțiilor hemotransmisibile și, totodată pentru sporirea eficacității testului.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea metodei de identificare a markerului infecției hemotransmisibile (anti-HTLV-1/2) prin reacția imunoenzimatică în scopul sporirii eficacității testului prin înlăturarea inhibitorilor nespecifici în serul pacienților și excluderea transmiterii acestor infecții prin transfuzii de sânge de la donatori.

5 Esența invenției constă în efectuarea testului imunoenzimatic, care include elaborarea unui
 10 martor reagent, care conține ser negativ anti-HTLV-1/2 și unui martor neutralizant, care conține
 ser pozitiv anti-HTLV-1/2, apoi se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-HTLV-1/2, în care se
 adaugă reagenții: în godeul A1 se adaugă 100 μl de martor reagent, în godeul B1 se adaugă 100 μl
 de martor neutralizant, în godeurile C1, E1 și G1 se adaugă câte 40 μl de diluant pentru probă,
 care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser cercetat, și
 15 câte 50 μl de martor reagent, iar în godeurile D1, F1 și H1 se adaugă câte 40 μl de diluant pentru
 probă, care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser
 cercetat, și câte 50 μl de martor neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C,
 timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon, care conține tris HCl
 20 tampon, 0,5% Tween 20 și 0,1% Proclin mM 300 și diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi
 în toate godeurile, cu excepția A1, se adaugă câte 100 μl de enzimă conjugată, care conține
 imunoglobulină anti-umană IgG și peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C,
 timp de 60 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluție tampon și se adaugă câte
 50 μl de cromogen, care conține soluție tampon citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μl de
 25 substrat, care conține soluție tampon de tetrametilbenzidină și se incubează la temperatura de
 18...24°C, timp de 30 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid
 sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densității optice la lungimea de undă de 450/620 nm
 și se calculează după formula: martor reagent/martor neutralizant pentru anti-HTLV-1/2, în cazul
 în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0
 - un rezultat pozitiv.

Rezultatul obținut: metoda propusă pentru identificarea markerului anti-HTLV-1/2 a infecțiilor
 hemotransmisibile face posibil realizarea investigației cu aceleași seruri prin folosirea ambelor
 tehnologii concomitent cu obținerea rezultatelor scontate în timp de 3 ore cu economisirea surselor
 financiare.

30 Avantajele: sensibilitatea și specificitatea înaltă în comparație cu metoda imunoenzimatică
 clasică, utilizată în calitate de cea mai apropiată soluție, tehnologie de utilizare accesibilă pentru
 toate laboratoarele unităților sanitare-medice de diferite nivele de asistență medicală, prețul
 reagenților utilizați accesibil.

Exemplu de realizare a invenției.

35 Serurile pacienților cu rezultatele incerte se testează la markerul infecției hemotransmisibile
 anti-HTLV-1/2. Pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici (rezultatele incerte) identificate în
 ELISA se aplică metoda de investigație propusă.

40 Metoda de confirmare a markerului anti-HTLV-1/2 constă în elaborarea martorului reagent
 (MR), care conține ser negativ la anti-HTLV-1/2 și martor neutralizant (MN), care conține ser
 pozitiv la anti-HTLV-1/2.

Tabelul 1

	I strip - anti-HTLV-1/2
A1	100 μl martor reagent
B1	100 μl martor neutralizant
C1	40 μl diluant pentru probă+ 10 μl ser 1+ 50 μl martor reagent
D1	40 μl diluant pentru probă+ 10 μl ser 1+ 50 μl martor neutralizant
E1	40 μl diluant pentru probă+ 10 μl ser 2+ 50 μl martor reagent
F1	40 μl diluant pentru probă+ 10 μl ser 2+ 50 μl martor neutralizant
G1	40 μl diluant pentru probă+ 10 μl ser 3+ 50 μl martor reagent
H1	40 μl diluant pentru probă+ 10 μl ser 3+ 50 μl martor neutralizant

Schema investigațiilor la prezența markerului infecției hemotransmisibile anti-HTLV-1/2 este prezentat în tabelul 1.

Metoda de identificare a markerului anti-HTLV-1/2 în serul sangvin uman constă în efectuarea testului imunoenzimatic, care include elaborarea unui martor reagent, care conține ser negativ anti-HTLV-1/2 și unui martor neutralizant, care conține ser pozitiv anti-HTLV-1/2, apoi se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-HTLV-1/2, în care se adaugă reagenții: în godeul A1 se adaugă 100 μl de martor reagent, în godeul B1 se adaugă 100 μl de martor neutralizant, în godeurile C1, E1 și G1 se adaugă câte 40 μl de diluant pentru probă, care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser cercetat, și câte 50 μl de martor reagent, iar în godeurile D1, F1 și H1 se adaugă câte 40 μl de diluant pentru probă, care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser cercetat, și câte 50 μl de martor neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon, care conține tris HCl tampon, 0,5% Tween 20 și 0,1% Proclin mM 300 și diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi în toate godeurile, cu excepția A1, se adaugă câte 100 μl de enzimă conjugată, care conține imunoglobulină anti-umană IgG și peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C, timp de 60 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluție tampon și se adaugă câte 50 μl de cromogen, care conține soluție tampon citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μl de substrat, care conține soluție tampon de tetrametilbenzidină și se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densității optice la lungimea de undă de 450/620 nm și se calculează după formula: martor reagent/martor neutralizant pentru anti-HTLV-1/2, în cazul în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0 - un rezultat pozitiv.

Rezultatele investigațiilor de laborator la prezența infecției hemotransmisibile de HTLV-1/2 sunt prezentate în tabelul 2.

Analiza și evaluarea ulterioară a rezultatelor investigațiilor de laborator la prezența markerului anti-HTLV-1/2 prin metoda cunoscută demonstrează prezența acestora în 10,1±3,4% de cazuri, probele incerte au fost depistate în 3,8±2,2%, iar cele negative – 86,1±3,9% de cazuri. Rezultatele investigațiilor de laborator la prezența markerului anti-HTLV-1/2 prin metoda revendicată demonstrează prezența markerului anti-HTLV-1/2 în 10,1±3,4%. Ulterior prin metoda de confirmare propusă cele 3 probe incerte s-au dovedit a fi negative. Așadar, metoda propusă de identificare a markerului anti-HTLV-1/2 demonstrează o sporire semnificativă (până la 100%) a sensibilității și specificității metodei de identificare a markerului anti-HTLV-1/2, în special pentru serurile incerte la prezența markerului nominalizat. Metoda propusă privind investigarea persoanelor, inclusiv cu risc sporit de infectare (donatorii de sânge, pacienții hemodializați, lucrătorii medicali, utilizatorii de droguri intravenoase etc) la markerul anti-HTLV-1/2 urmare a valorificării în practica medicală va contribui la reducerea semnificativă a riscului de infectare cu infecția hemotransmisibilă HTLV-1/2, în special în sistemele de transfuzie a sangelui, transplant, proceduri de hemodializă etc.

Rezultatele identificării markerilor anti- HTLV-1/2 la utilizatorii de droguri intravenoase

40

Tabelul 2

Utilizatori de droguri intravenoase	Nr.de probe investigate	Rezultatele investigațiilor la prezența markerilor infecțiilor hemotransmisibile										
		Metoda cunoscută						Metoda revendicată				
		Pozitiv		Incert		Negativ		Pozitiv		Incert	Negativ	
		Total	M+m	Total	M+m	Total	M+m	Total	M+m	Total	Total	M+m
79	79	8	10,1 ± 3,4	3	3,8 ± 2,2	68	86,1± 3,9	8	10,1± 3,4	0	71	89,9± 3,4

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Avioq HTLV-I/II Microelisa System, USA Research Triangle Park North Carolina 27709 CE 0086, June 2015, Găsit la 2020.02.11, Regăsit din: <http://fda.gov/media/83608/download>

(57) Revendicări:

Metodă de identificare a markerului anti-HTLV-1/2 în serul sangvin uman, care constă în efectuarea testului imunoenzimatic, care include elaborarea unui martor reagent, care conține ser negativ anti-HTLV-1/2 și unui martor neutralizant, care conține ser pozitiv anti-HTLV-1/2, apoi se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-HTLV-1/2, în care se adaugă reagenții: în godeul A1 se adaugă 100 μl de martor reagent, în godeul B1 se adaugă 100 μl de martor neutralizant, în godeurile C1, E1 și G1 se adaugă câte 40 μl de diluant pentru probă, care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser cercetat, și câte 50 μl de martor reagent, iar în godeurile D1, F1 și H1 se adaugă câte 40 μl de diluant pentru probă, care conține soluție tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină și 10 μl de ser cercetat, și câte 50 μl de martor neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon, care conține tris HCl tampon, 0,5% Tween 20 și 0,1% Proclin mM 300 și diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi în toate godeurile, cu excepția A1, se adaugă câte 100 μl de enzimă conjugată, care conține imunoglobulină anti-umană IgG și peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C, timp de 60 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluție tampon și se adaugă câte 50 μl de cromogen, care conține soluție tampon citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μl de substrat, care conține soluție tampon de tetrametilbenzidină și se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densității optice la lungimea de undă de 450/620 nm și se calculează după formula: martor reagent/martor neutralizant pentru anti-HTLV-1/2, în cazul în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0 - un rezultat pozitiv.